

**Maria Kapiszewska
Małgorzata Kalemba-Drożdż**

**OCENA
STANU
ODŻYWIENIA
ORGANIZMU**

**Maria Kapiszewska
Małgorzata Kalemba-Drożdż**

**OCENA
STANU
ODŻYWIENIA
ORGANIZMU**

PRACTICUM

Kraków 2014

Rada Wydawnicza Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego:
Klemens Budzowski, Maria Kapiszewska, Zbigniew Maciąg, Jacek M. Majchrowski

Recenzja: prof. dr hab. Zofia Zachwieja

Projekt okładki: Oleg Aleksejczuk

Korekta: zespół

Adiustacja: Filip Szczurek

ISBN 978-83-7571-262-9

Copyright© by Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
Kraków 2014

Żadna część tej publikacji nie może być powielana ani magazynowana
w sposób umożliwiający ponowne wykorzystanie,
ani też rozpowszechniana w jakiegokolwiek formie
za pomocą środków elektronicznych, mechanicznych, kopiujących,
nagrywających i innych, bez uprzedniej pisemnej zgody właściciela praw autorskich

Na zlecenie:



Krakowskiej Akademii
im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
www.ka.edu.pl

Wydawca:

Krakowskie Towarzystwo Edukacyjne sp. z o.o. – Oficyna Wydawnicza AFM,
Kraków 2014

Sprzedaż prowadzi:

Księgarnia U Frycza

Kampus Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego

ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków

tel./faks: (12) 252 45 93

e-mail: ksiegarnia@kte.pl

Skład: Oleg Aleksejczuk

Druk i oprawa: Krakowskie Towarzystwo Edukacyjne sp. z o.o.

Spis treści

Przedmowa	7
1. Antropometryczna ocena zdrowia – techniki stosowane w badaniach składu ciała.....	11
2. Ocena zapotrzebowania energetycznego organizmu	21
3. Węglowodany i ich metabolizm	35
4. Wydatek energetyczny podczas wysiłku fizycznego	47
5. Ocena sposobu żywienia	59
6. Piramida żywieniowa	65
7. Nadwaga i normalizacja masy ciała	75
8. Alergie i nietolerancje pokarmowe	77
9. Zaburzenia przyjmowania pokarmów (<i>Barbara Józefik</i>)	85
10. Wpływ sposobu odżywiania na ryzyko chorób nowotworowych	91
11. Oznaczanie potencjału antyoksydacyjnego materiału biologicznego metodą FRAP.....	95
12. Flawonoidy (<i>Agnieszka Cierniak</i>)	103
13. Stan wysycenia organizmu witaminą C.....	113
14. Polimorfizm genetyczny a ryzyko zachorowań na różne choroby. Zagadnienia bioetyczne	117
15. Wpływ wybranych czynników dietetycznych na stabilność genetyczną. Metody pomiaru uszkodzeń DNA	125
16. Zagadnienia zdrowia publicznego związane z odżywianiem, nadwagą i otyłością	145

Literatura podstawowa	147
Wykaz tabel i rycin zamieszczonych w tekście	149
Aneks	153

Przedmowa

Niniejsze opracowanie – ukierunkowane na *practicum* – przeznaczone jest dla studentów pierwszego i drugiego stopnia studiów biologicznych oraz innych kierunków obejmujących wiedzę o żywieniu człowieka. Proponowane zajęcia mają formę ćwiczeń laboratoryjnych, zajęć komputerowych lub konwersatoryjnych, a większość z nich, co istotne, nie wymaga bardzo drogiego i specjalistycznego sprzętu.

W opracowaniu podręcznika *Ocena stanu odżywienia organizmu*, oprócz prof. dr hab. Marii Kapiszewskiej i dr Małgorzaty Kalemby-Drożdż, wzięły także udział: dr Agnieszka Cierniak (flawonoidy) oraz prof. dr hab. Barbara Józefik (zaburzenia przyjmowania pokarmów).

*

Nowoczesna nauka o żywieniu człowieka wymaga nie tylko wiedzy z zakresu wartości odżywczych i kalorycznych produktów spożywczych, ale także poszukiwania zależności między antropometrycznymi parametrami, składem diety, polimorfizmami genetycznymi a ryzykiem zachorowań na choroby dietozależne. Wiedza ta powinna również obejmować mierzalne zmiany zachodzące w komórkach organizmu, a także w procesach biochemicznych w organizmie nieprawidłowo odżywiającego się człowieka. Analiza takich zmian wymaga zastosowania czułych biomarkerów. Niektóre z nich zostały omówione w tym podręczniku.

Ponadto zaproponowano studentom przeprowadzenie szeregu ćwiczeń wykorzystywanych w poradniach dietetycznych. Wszystkie dotyczą analizy sposobu żywienia, stanu odżywienia organizmu oraz konsekwencji, do jakich może prowadzić niewłaściwe odżywianie. Dużo uwagi poświęcono zależności pomiędzy składnikami antyoksydacyjnymi diety a jednym z bardzo czułych wskaźników, którym jest potencjał przeciwutleniający oznaczany metodą FRAP. Korzystając z tej prostej metody, zaproponowano ćwiczenie analizujące siłę antyoksydacyjną najczęściej spożywanych płynów, takich jak soki czy herbata.

Metoda FRAP posłużyła także do zmierzenia zdolności przeciwutleniających, chroniących organizm przed niszczącym działaniem wolnych rodników (dzięki analizie śliny). Spadek tych zdolności może znaleźć odzwierciedlenie w poziomie uszkodzeń DNA. Dzięki kolejnemu ćwiczeniu można zanalizować zależność pomiędzy poziomem uszkodzeń DNA w limfocytach (komórkach łatwych do wyizolowania z materiału biologicznego) a wielkością spożywanych składników żywieniowych o własnościach przeciwutleniających.

Autorzy zadbały również o zamieszczenie protokołu metody kometowej, zastosowanej do określania poziomu pęknięć nici DNA w komórkach, a także poziomu uszkodzeń oksydacyjnych. Zamieszczono również rezultaty badań własnych, pozwalające na przeprowadzenie tego ćwiczenia, nawet jeśli laboratorium nie posiada sprzętu potrzebnego do określania uszkodzeń DNA. Podniesiony poziom uszkodzeń DNA może być też wynikiem zmian w metabolizmie pewnych składników diety, wynikających ze spadku aktywności enzymów zaangażowanych w ten metabolizm, a kodowanych przez polimorficzne geny. Zagadnienia te są opisane w kolejnych ćwiczeniach, co umożliwia przeprowadzenie analiz zarówno w laboratorium, jak i przy wykorzystaniu zamieszczonych zdjęć żeli.

Każdy rozdział rozpoczyna stosowne wprowadzenie, a opisowi każdego ćwiczenia towarzyszy wstęp teoretyczny oraz wykaz przydatnej do poszerzenia wiedzy literatury przedmiotu.

O znaczeniu i nośności poruszanych w podręczniku zagadnień najlepiej świadczy fakt, że problemy zdrowotne związane z odżywianiem, nadwagą i otyłością stały się przedmiotem prac Komisji Ochrony Środowiska Naturalnego, Zdrowia Publicznego i Bezpieczeństwa Żywności Unii Europejskiej. W załączniku nr 1 znajduje się Sprawozdanie w sprawie białej księgi¹, dotyczące tych zagadnień i propozycja przeprowadzenia ćwiczeń z wykorzystaniem tych materiałów.

Autorzy przygotowali ćwiczenia zapoznające studentów z procedurami profesjonalnej oceny: prawidłowej masy ciała, parametrów antropometrycznych, zapotrzebowania energetycznego organizmu, wpływu aktywności fizycznej na masę ciała. Zamieszczono również konspekty do zajęć zwracających uwagę na problemy anoreksji, bulimii i nietolerancji pokarmowych.

Ponadto publikacja zawiera cenne uzupełnienie – wykaz adresów godnych polecenia stron internetowych, z których można korzystać, planując ćwiczenia z analizy poziomu spożycia grup żywności w różnych krajach, skategoryzowanych zarówno według indywidualnych

¹ Sprawozdanie w sprawie białej księgi na temat zagadnień zdrowotnych związanych z odżywianiem, nadwagą i otyłością (2007/2285(INI).

produktów spożywczych, jak i grup produktów. Zaproponowano także zadania z zastosowaniem tych danych; obejmują one analizę zależności pomiędzy sposobem odżywiania społeczeństw danego kraju a ryzykiem zachorowania na nowotwory.

Prezentowane ćwiczenia zostały celowo tak zaplanowane, aby rozwijały umiejętności przeprowadzenia eksperymentu, zaplanowania projektu badawczego i pozwalały na samodzielną analizę danych oraz interpretację otrzymanych wyników. Proponowane ćwiczenia są zróżnicowane pod względem poziomu trudności oraz niezbędnej do ich wykonania aparatury pomiarowej. Niektóre z nich wymagają podstawowej wiedzy z zakresu biochemii i genetyki.

*

UWAGA

Do wykonania niektórych ćwiczeń przydatne będą pliki z danymi laboratoryjnymi oraz artykułami, które czytelnik podręcznika może pobrać ze strony internetowej Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego pod adresem:

<http://www.ka.edu.pl/zinm/publikacje>.

*

Przedstawiony zakres ćwiczeń pozwala na indywidualne ułożenie programu kursu w zależności od stopnia zaawansowania studentów oraz kompetencji, którymi student ma się wykazać po skończeniu kursu.

Autorzy chętnie udzielą wszelkich wskazówek i podzielą się swoimi doświadczeniami nabytymi w trakcie wieloletniego prowadzenia tych zajęć.

Adres do kontaktu:

maria.kapiszewska@gmail.com

mkdrozdz@gmail.com

1. Antropometryczna ocena zdrowia

— techniki stosowane w badaniach składu ciała

WSTĘP

Antropometria to metoda badawcza polegająca na pomiarach porównawczych części ciała ludzkiego, np. długości kości, objętości czaszki, głowy, proporcji ciała, masy ciała, rozstawu oczu. Antropometria posługuje się metodami statystycznymi i bazuje na założeniu, że kształt i wielkość szkieletu osób po 25 roku życia nie ulegają już większym zmianom. Najczęściej wykorzystywanymi pomiarami antropometrycznymi stosowanymi do oceny stopnia odżywienia organizmu (w tym niedoborów pokarmowych występujących przez dłuższy czas) to: wzrost, masa ciała (masa beztłuszczowa i tłuszczowa), obwód ramienia, grubość fałdu skóry ramienia, obwodu talii czy bioder. Metody antropometryczne są proste, bezpośrednie i nieinwazyjne oraz możliwe do zastosowania podczas badań na dużych populacjach. Wymagają jednak dołożenia wszelkiej staranności od osoby przeprowadzającej badanie w celu minimalizacji błędu pomiarowego o charakterze losowym. Błąd taki określa przypadkowe odchylenie otrzymanego wyniku od wartości prawdziwej (uzyskany pomiar nie jest miarą tego, co w założeniu miał mierzyć). Występowanie dużego błędu losowego związanego z pomiarem antropometrycznym może pociągać za sobą poważne konsekwencje podczas prowadzenia badań epidemiologicznych. Jego obecność może powodować niedoszacowanie prawdziwej siły związku pomiędzy badanymi cechami, np. zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie, a zachorowalnością na daną jednostkę chorobową, albo wręcz uniemożliwić wykrycie badanej zależności.

WSKAŹNIK MASY CIAŁA

Jednym z podstawowych pomiarów przy określeniu stanu zdrowia jest masa ciała. Do oceny masy ciała zwykle posługujemy się tzw. wskaźnikiem masy ciała (ang. *body mass index*, BMI). Jest to współczynnik określający przedział, w którym powinna znajdować się masa ciała, uwzględniając wzrost. Oblicza się go, dzieląc masę ciała podaną w kg przez kwadrat wzrostu podanego w metrach. Zakresy prawidłowej masy ciała (czyli normy, nadwagi i różnego stopnia otyłości na podstawie BMI) zostały określone przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) na podstawie wyników badań epidemiologicznych (zob. tabela 1).

Optymalne wartości BMI dla kobiet różnią się od wartości BMI dla mężczyzn i wynoszą odpowiednio: 18–25 dla kobiet i 19–27 dla mężczyzn. Wskaźnik BMI jest stosunkowo dobrym miernikiem ilości tkanki tłuszczowej w organizmie i służy do określenia ryzyka wystąpienia takich chorób jak: nadciśnienie, choroby serca, choroby układu krążenia, cukrzyca; czyli chorób, w których poziom tkanki tłuszczowej zdaje się odgrywać ważną rolę.

Wzór na optymalną masę ciała obliczony za pomocą BMI nie dotyczy: dzieci, które rosną; sportowców; osób o rozbudowanej masie mięśniowej oraz kobiet w ciąży.

BUDOWA KOŚĆCA

Optymalny zakres masy ciała powinien uwzględniać budowę kośćca. U osób grubokościstych kości mogą mieć większy udział w ciężarze ciała niż u osób o drobnych kościach.

Typ budowy kośćca wyznacza się, dzieląc wzrost przez obwód nadgarstka mierzony w najwyższym miejscu. Wartości, dla których przyporządkowano typ budowy, znajdują się w tabeli 2

POMIAR ZAWARTOŚCI TKANKI TŁUSZCZOWEJ

Wiarygodnym sposobem pomiaru ilości tkanki tłuszczowej jest pomiar oparty na różnicy w oporności elektrycznej tkanki tłuszczowej oraz tkanek beztłuszczowych (kości, mięśnie, tkanki łączne, krew itd.).

Tkanka tłuszczowa zawiera tylko 14% wody i jest prawie pozbawiona elektrolitu potasowego. Ma ona stałą gęstość: 0,9 g/cm³.

Tkanki beztłuszczowe zawierają ok. 72–74% wody i mają średnią gęstość 1,1 g/cm³, a stężenie potasu waha się w granicach: 60–70 mmol/kg u mężczyzn i 50–60 mmol/kg u kobiet.

Skład tkanek beztłuszczowych podlega wahaniom w zależności od wieku (u dzieci obserwuje się większą zawartość wody w organizmie), struktury kości (zrzeszotowanie), fizycznej sprawności (sportowcy mają lepiej rozwiniętą, o większej gęstości, tkankę mięśniową oraz kostną) oraz od stanu nawodnienia organizmu. Procentowa zawartość tłuszczu u osób o prawidłowej masie ciała jest większa u kobiet niż u mężczyzn oraz zwiększa się z wiekiem. Zbyt mała ilość tkanki tłuszczowej jest niebezpieczna dla zdrowia. Minimalna zawartość tłuszczu dla prawidłowego funkcjonowania organizmu wynosi około 12% dla kobiet i 5% dla mężczyzn.

GRUBOŚĆ FAŁDU SKÓRNEGO

Inną metodą pomiaru zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie jest zmierzenie grubości fałdu skórniego nad mięśniem trójgłowym ramienia (ang. *triceps skin fold*, TSF). Wartość ta pozwala na określenie zawartości podskórnej tkanki tłuszczowej, a pomiar ten dobrze koreluje z ogólną zawartością tkanki tłuszczowej w całym organizmie.

Większą dokładność uzyskuje się, mierząc jednocześnie grubość fałdu skórniego w dolnej części brzucha oraz na łopatkę.

Dopiero pomiar z tych trzech miejsc (łącznie) daje bardzo wiarygodny obraz ilości tkanki tłuszczowej w organizmie.

WSPÓŁCZYNNIK TALIA: BIODRA – WHR

Pomiary ilości tkanki tłuszczowej należy uzupełnić dodatkowymi pomiarami uwzględniającymi jej lokalizację w organizmie. Tłuszcz zgromadzony w okolicy brzucha stanowi znacznie większe zagrożenie dla zdrowia niż ten odkładający się w biodrach i udach. Lokalizację tę określa współczynnik WHR (ang. *waist-to-hip ratio*), czyli stosunek obwodu talii do obwodu bioder. Wskaźnik WHR pozwala diagnozować dwa typy odkładania się tkanki tłuszczowej:

- Typ brzuszny, androidalny, popularnie zwany jabłkiem, gdy WHR dla kobiet przekracza 0,8 oraz gdy dla mężczyzn WHR przekracza wartość 0,95 – wartości te są skorelowane z podwyższonym ryzykiem rozwoju miażdżycy i cukrzycy.
- Typ biodrowo-udowy, czyli gynoidalny, potocznie zwany gruszką, gdy WHR poniżej 0,8 dla kobiet i poniżej 0,95 dla mężczyzn. Ten typ jest mniej niebezpieczny dla zdrowia, jednak otyłość tego typu ma duży wpływ na powstawanie żylaków podudzi i zwyrodnień układu kostno-stawowego kończyn dolnych.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL

Ćwiczenie polega na wyznaczeniu parametrów antropologicznych oraz porównaniu ich z normami określającymi wartości optymalne dla zdrowia człowieka.

Zadanie 1:

Oblicz swój współczynnik masy ciała, posługując się poniższym wzorem:

$$\text{BMI} = \text{waga}[\text{kg}] / (\text{wzrost} [\text{m}])^2$$

Następnie wynik zaklasyfikuj do odpowiedniego przedziału korzystając z tabeli 1.

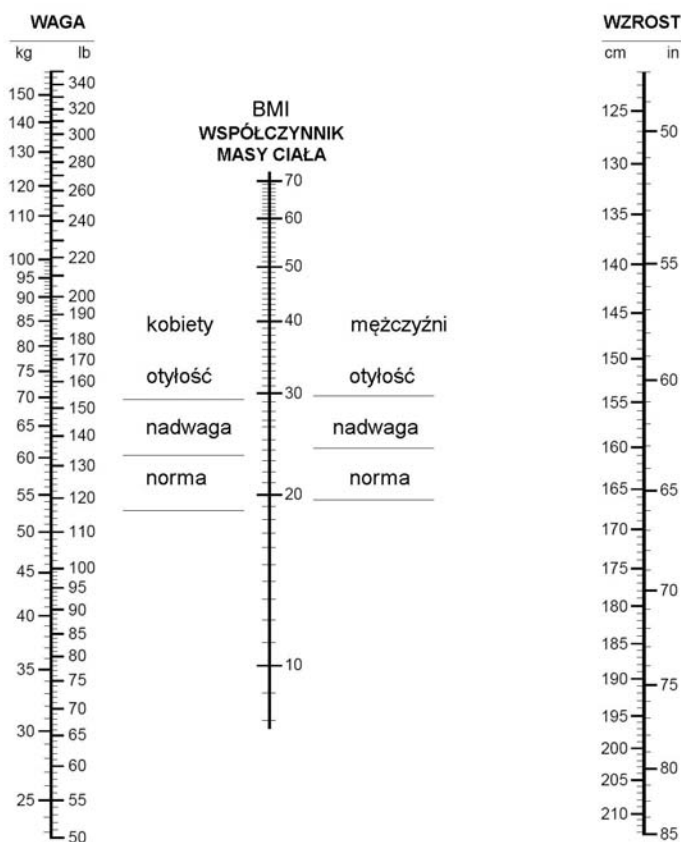
Tabela 1. Zakresy wskaźnika masy ciała z uwzględnieniem płci

Kobiety	Mężczyźni	Wniosek
BMI 18–24,9	BMI 19–26,9	Norma
BMI 25–29,9	BMI 27–29,9	Nadwaga
BMI 30–34,9	BMI 30–34,9	Otyłość
BMI 35–39,9	BMI 35–39,9	Poważna otyłość
BMI powyżej 40	BMI powyżej 40	Bardzo poważna otyłość

Źródło: opracowanie wg WHO.

Wartość BMI można również odczytać z nomogramu na rycinie 1. Współczynnik masy ciała wyznacza przecięcie linii poprowadzonej pomiędzy wartościami odpowiadającymi wadze a wzrostowi badanej osoby.

Rycina 1. Nomogram do wyznaczania współczynnika masy ciała (BMI)



Źródło: opracowano na podstawie: *Positively Aging* [materiały edukacyjne The University of Texas, Health Science Center, www.teachhealthk-12.uthscsa.edu]

Zadanie 2: W celu określenia typu budowy kośćca oblicz stosunek wzrostu [cm] do obwodu nadgarstka [cm] zmierzonego w największym miejscu. Następnie skorzystaj z tabeli 2, odczytując, w której grupie się znajdujesz.

Tabela 2. Określanie budowy kośćca metodą pomiaru obwodu nadgarstka

Budowa ciała	Kobiety	Mężczyźni
Drobnokoścista	>11	>10,4
Średniokoścista	11-10,1	10,4-9,6
Grubokoścista	<10,1	<9,6

Biorąc pod uwagę kategorię budowy ciała, za pomocą danych z tabeli 3, sprawdź, czy twoja masa ciała jest optymalna.

Tabela 3. Zakres optymalnej masy ciała uwzględniającej budowę kośćca

Kobiety	Zalecana masa ciała [kg]		
Wzrost [cm]	Drobny kościec	Średni kościec	Gruby kościec
145	45–49	48–54	52–58
147	45–50	49–55	53–60
150	46–51	50–56	54–61
152	47–52	51–57	55–62
155	48–54	52–59	57–64
157	49–55	54–60	58–65
160	50–56	55–61	60–67
163	52–58	56–63	61–69
165	53–59	58–64	62–70
168	55–60	59–65	64–73
170	56–62	60–67	65–78
173	57–63	62–68	66–76
175	59–65	63–70	68–77
178	60–66	65–71	69–79
180	61–67	66–72	70–80
Mężczyźni	zalecana masa ciała [kg]		
Wzrost [cm]	Drobny kościec	Średni kościec	Gruby kościec
155	56–59	57–62	60–66
157	57–60	58–63	61–67
160	58–60	59–64	62–69
163	59–61	60–65	63–70
165	60–62	61–66	64–72
168	60–64	62–68	65–74
170	61–65	64–69	67–76
173	62–66	65–70	68–78
175	63–68	66–72	70–80
178	64–69	68–73	71–81
180	65–70	69–75	72–83
183	67–72	70–77	74–85
185	68–74	72–79	76–87
188	70–76	74–80	78–90
191	71–78	75–83	80–92

Źródło: opracowano na podstawie: K. Mahan, S. Escott-Stump, *Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy*, Philadelphia 2000.

Zadanie 3: Dokonaj pomiaru zawartości tkanki tłuszczowej przy użyciu urządzenia badającego przewodnictwo organizmu np. Omron lub Tanita¹. Wynik odczytany z instrumentu porównujemy z normami zawartymi w tabeli 4.

Tabela 4. Rekomendowana procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie z uwzględnieniem płci i wieku badanej osoby

Płeć	Wiek	19–24	25–29	30–34	35–39	40–45
	Ocena	Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej				
Kobiety	Bardzo dobra	18,9–22,1	18,–22,0	19,7–22,7	21,0–24,0	22,6–25,6
	Dobra	22,1–25,0	22,0–25,4	22,7–26,4	24,0–27,7	25,6–29,3
	Nieprawidłowa	25,0–29,6	25,4–29,8	26,4–30,5	27,7–31,5	29,3–32,8
	Zła	>29,6	>29,8	>30,5	>31,5	>32,8
Mężczyźni	Bardzo dobra	10,8–14,9	12,8–16,5	14,5–18,0	16,1–19,4	17,5–20,5
	Dobra	14,9–19,0	16,5–20,3	18,0–21,5	19,4–22,6	20,5–23,6
	Nieprawidłowa	19,0–23,3	20,3–24,4	21,5–25,2	22,6–26,1	23,6–26,9
	Zła	>23,3	>24,4	>25,2	>26,1	>26,9

Źródło: opracowano na podstawie danych WHO.

Zadanie 4: Oblicz swój WHR. Zmierz obwód talii oraz obwód bioder za pomocą centymetra krawieckiego. Prowadź centymetr krawiecki tuż przy ciele, nie ściskając zbyt mocno ani nie zostawiając luzu, przez środek brzucha w najwęższym miejscu talii oraz w najszerszym miejscu bioder przez środek pośladków. Należy podzielić uzyskaną wartość obwodu talii [cm] przez wartość obwodu bioder [cm]. Wynik pozwoli określić rozmieszczenie tkanki tłuszczowej w twoim organizmie.

Jeśli jesteś kobietą, a twój wynik wynosi $>0,8$, to jesteś typem androidalnym; jeśli zaś wynosi $<0,8$, to twoja sylwetka zaliczana jest do typu gynoidalnego.

Jeśli jesteś mężczyzną, a twój wynik wynosi $>0,95$, to jesteś typem androidalnym, natomiast gdy wynik wynosi $<0,95$, twoja sylwetka zaliczana jest do typu gynoidalnego.

¹ **Uwaga:** na zajęcia należy przyjść po spożyciu lekkostrawnego posiłku nie później niż dwie godziny przed ich rozpoczęciem. Należy także pamiętać, iż badanie może dać fałszywy wynik, jeśli przed ćwiczeniami wypijemy znaczną ilość płynów, zjemy obfity posiłek lub będziemy wykonywać ćwiczenia fizyczne o dużym natężeniu.

Zadanie 5: Za pomocą fałdomierza (suwmiarki Harpendena) dokonaj pomiaru grubości fałdu skórno-mięśniowego nad mięśniem trójgłowym ramienia, a następnie odczytaj odpowiadającą mu ilość tkanki tłuszczowej (tabela 5). Porównaj wynik z pomiarem z zadania 3.

Tabela 5. Procentowy udział tkanki tłuszczowej w organizmie w zależności od grubości fałdu skórno-mięśniowego nad mięśniem trójgłowym ramienia

Grubość fałdu	Mężczyźni					Kobiety				
	Wiek					Wiek				
	17-19	20-29	30-39	40-49	50+	17-19	20-29	30-39	40-49	50+
10 mm	0,41	0,04	5,05	3,30	2,63	5,34	4,88	8,72	11,71	12,88
12 mm	2,46	2,1	6,86	5,61	5,20	7,60	7,27	10,85	13,81	15,10
14 mm	4,21	3,85	8,40	7,58	7,39	9,53	9,30	12,68	15,59	16,99
16 mm	5,74	5,38	9,74	9,31	9,31	11,21	11,08	14,27	17,15	18,65
18 mm	7,10	6,74	10,93	10,84	11,02	12,71	12,66	15,68	18,54	20,11
20 mm	8,32	7,96	12,00	12,22	12,55	14,05	14,08	16,95	19,78	21,44
22 mm	9,43	9,07	12,98	13,47	13,95	15,28	15,38	18,10	20,92	22,64
24 mm	10,45	10,09	13,87	14,62	15,23	16,40	16,57	19,16	21,95	23,74
26 mm	11,39	11,03	14,69	15,68	16,42	17,44	17,67	20,14	22,91	24,76
28 mm	12,26	11,91	15,46	16,67	17,53	18,40	18,69	21,05	23,80	25,71
30 mm	13,07	12,73	16,17	17,60	18,56	19,30	19,64	21,90	24,64	26,59
32 mm	13,84	13,49	16,84	18,47	19,53	20,15	20,54	22,70	25,42	27,42
34 mm	14,56	14,22	17,47	19,28	20,44	20,95	21,39	23,45	26,16	28,21
36 mm	15,25	14,90	18,07	20,06	21,31	21,71	22,19	24,16	26,85	28,95
38 mm	15,89	15,55	18,63	20,79	22,13	22,42	22,95	24,84	27,51	29,65
40 mm	16,51	16,17	19,17	21,49	22,92	23,10	23,67	25,48	28,14	30,32
42 mm	17,10	16,76	19,69	22,16	23,66	23,76	24,36	26,09	28,74	30,96
44 mm	17,66	17,32	20,18	22,80	24,38	24,38	25,02	26,68	29,32	31,57
46 mm	18,20	17,86	20,65	23,41	25,06	24,97	25,65	27,24	29,87	32,15
48 mm	18,71	18,37	21,10	24,00	25,72	25,54	26,26	27,78	30,39	32,71
50 mm	19,21	18,87	21,53	24,56	26,35	26,09	26,84	28,30	30,90	33,25
52 mm	19,69	19,35	21,95	25,10	26,96	26,62	27,40	28,79	31,39	33,77
54 mm	20,15	19,81	22,35	25,63	27,55	27,13	27,94	29,27	31,86	34,27
56 mm	20,59	20,26	22,73	26,13	28,11	27,63	28,47	29,74	32,31	34,75
58 mm	21,02	20,69	23,11	26,62	28,66	28,10	28,97	30,19	32,75	35,22
60 mm	21,44	21,11	23,47	27,09	29,20	28,57	29,46	30,62	33,17	35,67
62 mm	21,84	21,51	23,82	27,55	29,71	29,01	29,94	31,04	33,58	36,11
64 mm	22,23	21,90	24,16	28,00	30,21	29,45	30,40	31,45	33,98	36,53
66 mm	22,61	22,28	24,49	28,43	30,70	29,87	30,84	31,84	34,37	36,95

68 mm	22,98	22,65	24,81	28,85	31,17	30,28	31,28	32,23	34,75	37,35
70 mm	23,34	23,01	25,13	29,26	31,63	30,67	31,70	32,60	35,11	37,74
72 mm	23,69	23,36	25,43	29,66	32,07	31,06	32,11	32,97	35,47	38,12
74 mm	24,03	23,70	25,73	30,04	32,51	31,44	32,51	33,32	35,82	38,49
76 mm	24,36	24,03	26,01	30,42	32,93	31,81	32,91	33,67	36,15	38,85
78 mm	24,68	24,36	26,30	30,79	33,35	32,17	33,29	34,00	36,48	39,20
80 mm	25,00	24,67	26,57	31,15	33,75	32,52	33,66	34,33	36,81	39,54

Źródło: opracowano na podstawie: *Positively Aging*, op. cit.

Zadanie 6: Oblicz zawartość tkanki teoretyczną metodą opracowaną przez YMCA

Dla mężczyzn:

$$\% \text{ tk. tł.} = ((1.634 * T - 0.1804 * M - 98.42) / 2,2 * M) * 100$$

Dla kobiet:

$$\% \text{ tk. tł.} = ((1.634 * T - 0.1804 * M - 76.76) / 2,2 * M) * 100$$

gdzie T to obwód talii, a M to masa ciała.

Porównaj wynik obliczenia z pomiarem dokonany za pomocą metod empirycznych z zadania 3 i 5.

Jak myślisz, z czego wynikają różnice między wynikami?

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Malinowski A., Bożiłow W., *Podstawy Antropometrii. Metody, techniki, normy*, Warszawa 1997.

Wolański N., *Ekologia człowieka. Podstawy ochrony środowiska i zdrowia człowieka*, t. 1, *Wrażliwość na czynniki środowiska i biologiczne zmiany przystosowawcze*, Warszawa 2006.

Mahan K., Escott-Stump S., *Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy*, Philadelphia 2000.

NETOGRAFIA

Positively Aging [materiały edukacyjne The University of Texas, Health Science Center], www.teachhealthk-12.uthscsa.edu.

2. Ocena zapotrzebowania energetycznego organizmu

WSTĘP

Nadwaga lub otyłość wynikająca z nadmiaru tkanki tłuszczowej, oprócz uczucia psychicznego dyskomfortu, stanowi również realne zagrożenie dla zdrowia organizmu przez zwiększenie ryzyka zachorowalności na tzw. choroby cywilizacyjne, takie jak: nadciśnienie, miażdżyca, cukrzyca, choroba niedokrwienna serca, a nawet nowotwory. Badania wskazują, że spadek 10% masy ciała u osób otyłych powoduje spadek ryzyka zachorowalności na miażdżycę i zawał serca o 20%. Natomiast ponowny powrót do poprzedniej masy to ryzyko zwiększa.

Zachowanie zarówno dobrego zdrowia, jak i uniknięcie wahań masy ciała (w tym nadwagi i otyłości) jest uzależnione od utrzymania równowagi pomiędzy ilością energii dostarczanej do organizmu wraz z pożywieniem a wydatkami energetycznymi obejmującymi zarówno metabolizm, jak i aktywność fizyczną. Tzn. zdrowy dorosły człowiek powinien utrzymywać zerowy bilans energetyczny ustroju.

Podstawowa przemiana materii (PPM, ang. BMR – *basal metabolic rate*) to ilość energii wydatkowana przez organizm na podtrzymanie podstawowych funkcji życiowych: pracę wszystkich narządów (w tym mózgu) i układów, utrzymanie stałej ciepłoty ciała. PPM definiowana jest jako najniższy poziom przemian energetycznych, zachodzących u osobnika na czczo, po 12-godzinym spoczynku, mierzony w pozycji leżącej, w stanie zupełnego spokoju fizycznego i psychicznego, w odpowiednich warunkach bytowania, zapewniających dostarczenie energii niezbędnej do prawidłowego przebiegu procesów życiowych, w opty-

malnej temperaturze otoczenia (dla nagiego człowieka około 26–27°C). W przypadku niespełnienia jednego z powyższych warunków mierzona wartość określana jest jako SPM – spoczynkowa przemiana materii (ang. RMR – *resting metabolic rate*).

Poziom energii potrzebnej do pokrycia kosztów PPM podlega wahaniom w ciągu doby, przyjmując najniższe wartości podczas snu. Jej wartość zależy od:

- rozmiarów ciała (wzrost, waga),
- wieku – w ciągu pierwszych dwóch lat życia PPM jest największa, a po 21 roku życia maleje o około 2% po każdych kolejnych 10 latach życia, a najniższa jest po 70 roku życia,
- płci – ze względu na różnice w składzie ciała,
- typu metabolicznego.

Typy metaboliczne można ustalić podczas testów metabolicznych uwzględniających: ciśnienie krwi, tętno, test tolerancji glukozy, pH śliny i moczu, ciężar właściwy moczu, czas wstrzymania oddechu, liczbę oddechów na minutę oraz charakterystykę układu mięśniowo-szkieletowego i proporcje między różnymi częściami ciała.

Wpływ na natężenie procesów energetycznych mają również:

- stan zdrowia (gorączka powyżej 37°C podwyższa PPM),
- stopień odżywienia organizmu (długotrwałe głodzenie obniża PPM),
- aktywność gruczołów (niedoczynność tarczycy obniża PPM nawet o 40%, a nadczynność tarczycy podwyższa PPM o 80%, adrenalina podwyższa SPM),
- niektóre leki (amfetamina, β -blokery obniżają PPM),
- czynniki genetyczne.

PPM jest niższa u kobiet o ok. 5–10% ze względu na statystycznie większy udział tkanek niemetalizujących. I tak np. u 70 kg mężczyzny PPM wynosi średnio 1650 kcal, a u 58 kg kobiety około 1150 kcal.

Całkowita przemiana materii (CPM) wyznacza dzienne zapotrzebowanie energetyczne, uwzględniając: podstawową (PPM) oraz ponadpodstawową przemianę materii. Ponadpodstawowa przemiana materii (PPPM) obejmuje codzienne czynności, aktywność fizyczną i umysłową organizmu, jak również ilość energii potrzebną na strawienie i wchłonięcie zjedzonego pożywienia, czyli tzw. swoiste ciepłotwórcze działanie pokarmu (termogeneza poposiłkowa).

Termogeneza poposiłkowa to okresowy wzrost natężenia przemiany materii związany z trawieniem, wchłanianiem i transportem skład-

ników odżywczych. Jej wartość zależy od ilości i składu przyjmowanego pożywienia. Na przykład spożycie białek wywołuje wzrost przemiany materii o ok. 20% dostarczonych kalorii netto, tłuszczu o 5–10%, a węglowodanów o 6% (średnio w przypadku diety mieszanej to 10% PPM).

Czynniki, które wpływają na intensywność przemiany materii, to: płeć, wiek, rozmiary ciała, stan fizjologiczny, stan zdrowia i odżywienia, funkcjonowanie gruczołów dokrewnych, czynniki genetyczne, typ metaboliczny, rodzaj bytowania, typ wykonywanej pracy, temperatura otoczenia.

Podczas wszystkich przemian energetycznych zachodzących w organizmie dochodzi do rozpraszania części energii w postaci ciepła. Procesy te zwane są termogenezą; znamy kilka jej rodzajów w zależności od procesów, którym towarzyszą. Termogeneza bezdrżeniowa obejmuje swoiste ciepłotwórcze działanie pokarmu i termogenezę konstytutywną odpowiedzialną za utrzymanie stałej temperatury ciała. Natomiast przebywanie w niskiej temperaturze lub przeżycie silnego stresu prowadzi do termogenezy drżeniowej. Nieświadome drżenie mięśni szkieletowych zwiększa zużycie energii, a duża jej część, rozpraszając się w postaci ciepła, ogrzewa tkanki.

Optymalna energetyka zdrowego dojrzałego organizmu jest osiągnięta, jeżeli występuje zerowy bilans energetyczny, tzn. jeżeli ilość energii pobranej z pokarmem jest równa ilości energii wydatkowanej przez organizm. Dodatni bilans energetyczny, czyli nadmiar spożywanej energii w stosunku do potrzeb organizmu, skutkuje magazynowaniem tej energii w postaci tkanki tłuszczowej. Ujemny bilans energetyczny prowadzi do osłabienia organizmu i zużywania materiałów zapasowych.

Organizm posiada zdolności adaptacyjne przeciwdziałające zarówno okresowemu niedożywieniu, jak i przeżywaniu.

Adaptacja do niedożywienia

Niedożywienie kaloryczne powoduje:

- spadek termogenezy indukowanej pożywieniem,
- spadek PPM (ograniczenie aktywności współczulnego układu nerwowego), nawet o 5–8%,
- spadek masy ciała,
- zmniejszenie wydatków energetycznych na pracę mięśni,
- nasilenie termogenezy drżeniowej (spadek ilości tkanki tłuszczowej),
- ustabilizowanie zmniejszonej masy ciała (nowa równowaga energetyczna).

Adaptacja do przeżywania

Dodatni bilans energetyczny powoduje:

- wzrost ciepłotwórczego działania pokarmu,
- przyrost masy ciała i towarzyszący mu wzrost wydatków na PPM,
- zwiększenie aktywności brunatnej tkanki tłuszczowej,
- zwiększenie wydzielania leptyny, hormonu wytwarzanego w tkance tłuszczowej i aktywnego w procesie kontroli pobierania pokarmu.

Podstawową i całkowitą przemianę materii można zmierzyć, stosując metodę **kalorymetrii bezpośredniej** w tak zwanych komorach kalorymetrycznych. Jest to pomieszczenie całkowicie izolowane od otoczenia, pozwalające zmierzyć ilość ciepła wytworzonego przez organizm w jednostce czasu. W metodzie tej przyjmuje się założenie, że wszystkim procesom energetycznym zachodzącym w organizmie towarzyszy rozpraszanie części tej energii w postaci ciepła.

Inną metodą pomiaru przemiany materii jest **metoda kalorymetrii pośredniej**, w której mierzy się ilość zużytego tlenu i/lub wydychanego dwutlenku węgla, ostatecznego produktu utleniania składników pokarmowych. Ilość wydzielanego ciepła, dwutlenku węgla, jak i zużywanego tlenu jest proporcjonalna do ilości zużytej przez organizm energii.

Metody kalorymetryczne posłużyły do opracowania matematycznych wzorów oraz nomogramów, według których można obliczyć z dużą dokładnością podstawową przemianę materii, czyli ilość energii potrzebnej do pokrycia fizjologicznego funkcjonowania organizmu

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

CEL

Obliczenie ilości energii wydatkowanej na potrzeby fizjologiczne, utrzymanie stałej ciepłoty ciała i pokrycie kosztów trawienia, a także na wykonywanie określonych czynności. Ustalenie indywidualnego zapotrzebowania energetycznego organizmu (PPM oraz CPM) w dniu powszednim i dniu wolnym od pracy (nauki) na podstawie dostępnych wzorów i nomogramów. Porównanie metod arytmetycznych i graficznych w ustalaniu bilansu energetycznego ustroju.

Zadanie 1: Oblicz swoją podstawową przemianę materii (PPM), korzystając z zamieszczonych poniżej wzorów i wykorzystując podstawowe dane antropometryczne (wiek, waga, wzrost).

Wzór Harrisa i Benedicta (1919)

dla kobiet $PPM = 655,09 + 9,56 \times M + 1,85 \times W - 4,68 \times A$ [kcal/24h]

dla mężczyzn $PPM = 66,47 + 13,75 \times M + 5 \times W - 6,75 \times A$ [kcal/24h]

Wzór Bernsteina (1983)

dla kobiet $PPM = 7,46 \times M - 0,42 \times W - 3 \times A + 844$ [kcal/24h]

dla mężczyzn $PPM = 11 \times M + 10,2 \times W - 5,8 \times A - 1032$ [kcal/24h]

Wzór Mifflina (1990)

dla kobiet $PPM = 9,99 \times M + 6,25 \times W - 4,92 \times A - 161$ [kcal/24h]

dla mężczyzn $PPM = 9,99 \times M + 6,25 \times W - 4,92 \times A + 5$ [kcal/24h]

M – masa ciała w kg, W – wzrost w cm, A – wiek w latach

Oblicz również PPM z zależności: 1 kcal na każdy kg masy ciała na godzinę:

$$PPM = M \times 24 \text{ [kcal/24h]}$$

Sprawdź, czy występują różnice w uzyskanych wynikach.

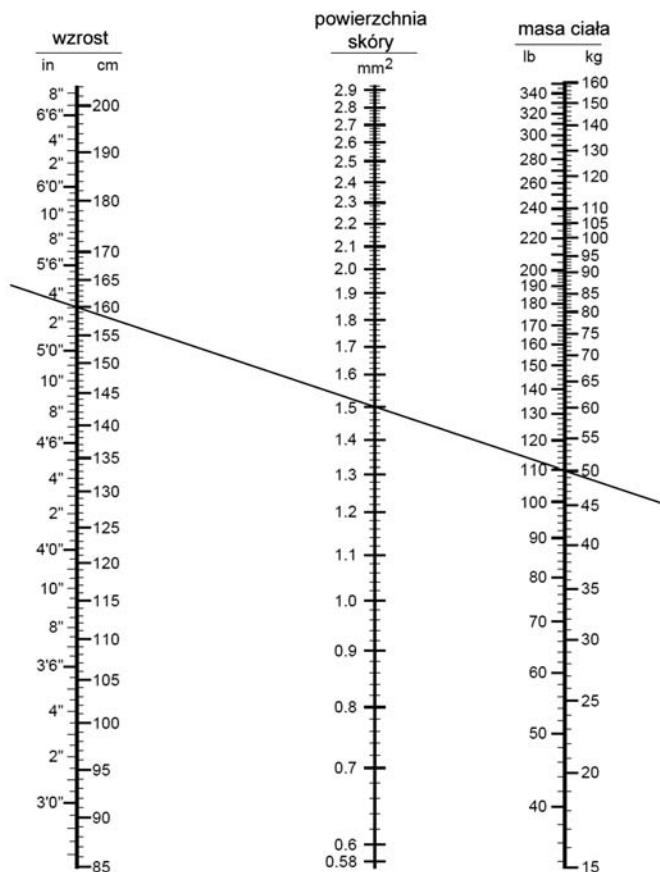
Zastanów się, z czego mogą one wynikać?

Zadanie 2: Oblicz PPM, w oparciu o rozmiar powierzchni skóry ciała na podstawie nomogramu (rycina 2) i norm energetycznych (tabela 6).

Wartość powierzchni skóry odczytaną z nomogramu (rycina 2) należy pomnożyć przez współczynnik z tabeli 6 odpowiedni dla wieku i płci, a następnie pomnożyć przez 24 godziny.

Porównaj wynik z obliczeniami z zadania 1.

Rycina 2. Nomogram do obliczania powierzchni skóry człowieka



Uwaga: należy przeprowadzić prostą linię pomiędzy wzrostem i masą ciała, a z miejsca przecięcia środkowej osi należy odczytać wielkość powierzchni ciała

Źródło: opracowano na podstawie: *Positively Aging, op. cit.*

Tabela 6. Współczynniki podstawowego zapotrzebowania energetycznego na 1 m^2 powierzchni skóry w ciągu jednej godziny

Wiek	Mężczyźni	Kobiety	Wiek	Mężczyźni	Kobiety
lata	kcal/ m^2/h	kcal/ m^2/h	lata	kcal/ m^2/h	kcal/ m^2/h
3	60,1	54,5	26	38,2	35,0
4	57,9	53,9	27	38,0	35,0
5	56,3	53,0	28	37,8	35,0
6	54,0	51,2	29	37,7	35,0
7	52,3	49,7	30	37,6	35,0

8	50,8	48,0	31	37,4	35,0
9	49,5	46,2	32	37,2	34,9
10	47,7	44,9	33	37,1	34,9
11	46,5	43,5	34	37,0	34,9
12	45,3	42,0	35	36,9	34,8
13	44,5	40,5	36	36,8	34,7
14	43,8	39,2	37	36,7	34,6
15	42,9	38,3	38	36,7	34,5
16	42,0	37,2	39	36,6	34,4
17	41,5	36,4	40-44	36,4	34,1
18	40,8	35,8	45-49	36,2	33,8
19	40,5	35,4	50-54	35,8	33,1
20	39,9	35,3	55-59	35,1	32,8
21	39,5	35,2	60-64	34,5	32,0
22	39,2	35,2	65-69	33,5	31,6
23	39,0	35,2	70-74	32,7	31,1
24	38,7	35,1	75+	31,8	30,0
25	38,4	35,1			

Źródło: opracowano na podstawie *Positively Aging, op. cit.*

Zadanie 3: Oblicz całkowitą ilość energii wydatkowanej w ciągu dnia, biorąc pod uwagę poziom swojej aktywności zawodowej i pozazawodowej. Pomnóż współczynnik odpowiadający twojej aktywności (tabela 7) przez najniższą obliczoną dla siebie wartość PPM z zadania 1. Klasyfikację własnego poziomu aktywności ułatwi.

Tabela 7. Współczynniki do obliczenia całkowitego wydatku energetycznego w zależności od stopnia aktywności zawodowej i pozazawodowej

		Poziom aktywności zawodowej					
		Niski		Średni		Wysoki	
		Kobiety	Męż- czyźni	Kobiety	Męż- czyźni	Kobiety	Męż- czyźni
Poziom aktywności pozazawo- dowej	Niski	1,4	1,4	1,5	1,6	1,6	1,8
	Średni	1,5	1,5	1,6	1,7	1,7	1,9
	Wysoki	1,6	1,6	1,7	1,8	1,8	2,0

Źródło: opracowane przez Departament Zdrowia i Opieki Społecznej USA (za: *Żywnienie człowieka, t. 1: Podstawy żywienia człowieka*, red. J. Gawęcki, L. Hryniewiecki, Warszawa 2006).

Tabela 8. Przykładowa klasyfikacja aktywności życiowej według wykonywanych czynności

Poziom			
Niski	Średni	Wysoki	Bardzo wysoki
Czynności siedzące, które nie są żmudne	Czynności wykonywane na stojąco	Ciężkie prace domowe	Akrobatyka
Czytanie	Czynności pielęgnacyjne, higieniczne	Wyczerpująca praca fizyczna	Jazda na rowerze
Gra w karty	Gotowanie	Mycie okien	Koszykówka
Jedzenie	Spacer	Odkurzanie	Narciarstwo
Odrabianie lekcji	Ścienienie łóżka	Ogrodnictwo	Piłka nożna
Oglądanie telewizji	Zamiatanie	Stolarka	Pływanie
Pisanie	Zmywanie naczyń	Szybki chód	Szybki bieg
Siedzenie na wykładzie	Zmywanie podłogi		Taniec wyczynowy
Szydełkowanie, szycie			Tenis

Źródło: opracowano na podstawie *Positively Aging*, op. cit.

Zadanie 4: Oblicz ilość energii wydatkowanej dziennie na różnego rodzaju czynności, korzystając z tabeli 9. W tym celu sporządź listę czynności, które zazwyczaj wykonujesz w ciągu doby. Następnie określ przybliżony czas ich wykonywania (sprawdź, czy sumaryczny czas wynosi 24 godziny). Pomnóż ilość czasu spędzonego na wykonaniu danej czynności przez ilość energii potrzebnej na wykonanie tej czynności w jednostce czasu odczytaną z tabeli 9 oraz przez swoją masę ciała w kg.

Jeżeli jednocześnie wykonujesz dwie czynności (np. siedzenie i czytanie), wybierz współczynnik energetyczny dla czynności bardziej energochłonnej.

Natomiast jeżeli w tabeli nie znajdziesz współczynnika dla interesującej cię czynności, zastanów się, do jakiej czynności zamieszczonej w tabeli można porównać ten wysiłek.

Sporządź obliczenia dla dnia roboczego oraz dnia weekendowego. Porównaj wyniki i je skomentuj.

Tabela 9. Ilość energii wydatkowanej podczas wykonywania różnych form aktywności

Czynność	kcal/kg/h	kcal/kg/10 min
Aerobik	7,857	1,310
Aerobik w wodzie	8,286	1,381
Bieg długodystansowy	10,600	1,767
Bieg sprinterski	33,080	5,513
Bieg szybki (km przez 3,40 min)	17,143	2,857
Bieg umiarkowany (km w 5 min)	15,910	2,652
Chodzenie	3,600	0,600
Chodzenie po sklepie	3,571	0,595
Czytanie	0,535	0,089
Czytanie głośno	2,143	0,357
Ćwiczenia na siłowni	5,714	0,952
Gimnastyka intensywna	4,286	0,714
Uprawianie jogi	4,114	0,686
Gimnastyka lekka	3,000	0,500
Golf	3,600	0,600
Gotowanie	1,500	0,250
Gra na pianinie	1,714	0,286
Gra w badmintona	5,714	0,952
Gra w kręgle	4,286	0,714
Gra w piłkę nożną	9,286	1,548
Gra w ping-ponga	6,600	1,100
Gra w squasha	7,100	1,183
Gra w tenisa	9,090	1,515
Jazda konna	9,286	1,548
Jazda na deskorolce	5,300	0,883
Jazda na nartach biegowych	8,200	1,367
Jazda na nartach wodnych	6,300	1,050
Jazda na nartach zjazdowych	7,300	1,217
Jazda na rolkach/łyżwach	5,714	0,952
Jazda na rowerze (10 km/h)	6,429	1,072
Jazda na rowerze (20 km/h)	8,571	1,429
Jedzenie	0,600	0,100

Kopanie, grabienie	7,143	1,191
Koszykówka	7,857	1,310
Lekka praca biurowa	2,000	0,333
Leżenie	0,150	0,025
Marsz	5,100	0,850
Marszobieg	7,143	1,191
Mycie naczyń	1,500	0,250
Mycie okien	5,460	0,910
Mycie podłogi	3,990	0,665
Odkurzanie	3,700	0,617
Oglądanie telewizji	0,150	0,025
Piłowanie drewna	6,429	1,072
Pisanie na komputerze	1,500	0,250
Pisanie ręczne	1,950	0,325
Pływanie	11,850	1,975
Praca ekspedientki	2,000	0,333
Praca kamieniarska	5,714	0,952
Praca w ogródku	3,571	0,595
Pranie ręczne lekkie	1,950	0,325
Pranie ręczne tradycyjne	3,210	0,535
Prasowanie	3,760	0,627
Prowadzenie motocykla	3,190	0,532
Prowadzenie samochodu	1,350	0,225
Prysznic	1,200	0,200
Robienie na drutach	0,786	0,131
Robienie zakupów	4,286	0,714
Rozmowa	0,405	0,068
Schodzenie ze schodów	6,700	1,117
Sen	0,170	0,028
Siatkówka	6,429	1,072
Siatkówka plażowa	8,400	1,400
Siedzenie	0,400	0,067
Skakanie na skakance	8,200	1,367
Słanie łóżka	2,857	0,476
Spacer w szybkim tempie	4,286	0,714

Spacer w umiarkowanym tempie	2,857	0,476
Sprzątanie łazienki	3,429	0,572
Sprzątanie pokoju	2,571	0,429
Stanie	0,150	0,025
Stanie na baczność	1,643	0,274
Szorowanie podłóg	6,086	1,014
Szycie na maszynie	1,929	0,322
Szycie ręczne	1,586	0,264
Ścieranie kurzy	2,429	0,405
Śpiew	1,800	0,300
Taniec szybki	7,300	1,217
Taniec wolny	0,900	0,150
Toaleta	1,660	0,277
Trzepanie dywanów	3,714	0,619
Ubieranie się	1,050	0,175
Wchodzenie po schodach	15,714	2,619
Wiosłowanie	7,143	1,191
Zajęcia lekcyjne bierne	0,430	0,072
Zajęcia lekcyjne czynne	1,470	0,245
Zamiatanie podłogi	2,210	0,368

Źródło: opracowano na podstawie: K. Mahan, S. Escott-Stump, *Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy*, Philadelphia 2000; *Żywność człowieka*, t. 1: Podstawy żywienia człowieka, red. J. Gawęcki, L. Hryniewiecki, Warszawa 2006 oraz *Positively Aging*, op. cit.

UWAGA

Należy pamiętać, że dla kobiet w ciąży zapotrzebowanie energetyczne jest wyższe o potrzeby energetyczne rozwijającego się płodu (średnio 300 kcal w drugiej połowie ciąży), natomiast karmienie piersią to dodatkowy wydatek energetyczny rzędu 500 kcal dziennie.

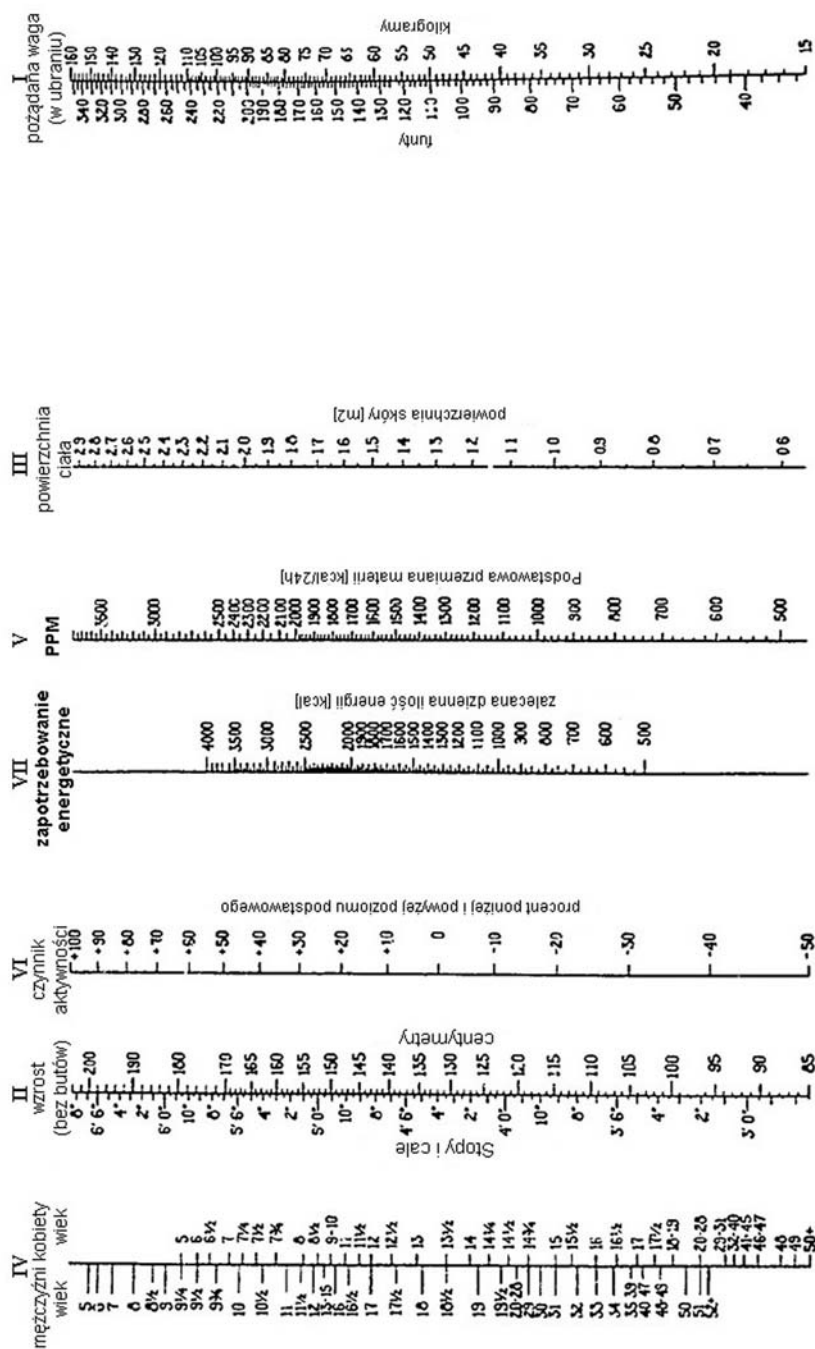
Porównaj uzyskany wynik z obliczeniami z zadania 3.

Zastanów się, czy prawidłowo oceniłeś swój poziom aktywności.

Zadanie 5: Oblicz całkowite zapotrzebowanie energetyczne, korzystając z nomogramu uwzględniającego parametry antropometryczne (Rycina 3): Nomogram w wysokiej rozdzielczości znajdziesz w załączniku nr 2.

Porównaj wynik uzyskany z nomogramu ze swoimi poprzednimi obliczeniami i przedyskutuj ewentualne różnice.

Rycina 3. Nomogram do wyliczania zapotrzebowania energetycznego



Źródło: za Molleson A.L., Gallagher-Allred C.R., Normal Diet: Geriatrics. Nutrition in Primary Care, Columbus 1980.

Instrukcja użycia nomogramu do obliczenia dziennego zapotrzebowania energetycznego:

Znajdź swoją wagę w kolumnie I oraz swój wzrost w kolumnie II. Połącz te punkty linią, odczytaj i zapisz wartość odpowiadającą powierzchni skóry w kolumnie III, w miejscu przechodzącej przez które wyznaczona prosta. Znajdź swój wiek w kolumnie IV (uwzględniając płęć) i połącz ten punkt ze znalezionym uprzednio punktem odpowiadającym powierzchni ni skóry. Prosta przecinając kolumnę V (PPM) wyznaczy wartość podstawowej przemiany materii. Wartość całkowitego zapotrzebowania energetycznego (kolumna VII) uzyskasz łącząc punkt znaleziony na kolumnie V ze stopniem natężenia aktywności fizycznej, którą należy wybrać w kolumnie VI (współczynnik aktywności) – gdzie: 50-80% – odpowiada intensywności pracy fizycznej, 30-40% – siedzącemu trybowi życia, 10-20% – bardzo ograniczonej aktywności ruchowej.

Zadanie 6. Dokonaj następujących obliczeń:

A) Oblicz, o ile kalorii był za wysoki bilans energetyczny 40-letniego mężczyzny, którego masa ciała wzrosła z 65 do 75 kg w ciągu ostatnich 10 lat. Uwzględnij fakt, iż zawartość tłuszczu w masie tłuszczowej ciała wynosi ok. 80%, a 1 g tłuszczu dostarcza 9 kcal.

B) O ile zmieni się ilość energii pobieranej w ciągu roku, jeżeli codziennie szklankę mleka tłustego zastąpi się mlekiem chudym i raz w tygodniu zrezygnuje się ze zjedzenia batonika czekoladowego?

Szklanka pełnego = 130 kcal; szklanka chudego = 80 kcal; batonik czekoladowy = 300 kcal.

C) Oblicz, jak długo osoba ważąca 75 kg powinna np. spacerować, biegać, pływać oraz odkurzać mieszkanie, żeby spalić 500 kcal? Jaka będzie różnica energetyczna, jeżeli codziennie w ciągu roku zamiast jechać windą na trzecie piętro (stanie przez 2 min), pójdzie po schodach (6 min marszu)?

D) Uwzględniając wynik obliczeń z punktu A, zastanów się, czy strategie obniżania bilansu energetycznego z punktów B i C mogłyby zapobiec zwiększeniu się (lub pomogły w zmniejszeniu) masy ciała analizowanej osoby, jeżeli byłyby stosowane codziennie.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

McLaughlin D., Stamford J., White D., *Fizjologia człowieka. Krótkie wykłady*, Warszawa 2008.

Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej, red. W.Z. Traczyk, A. Trzebski, Warszawa 2007.

Sawicki W., Malejczyk W., *Histologia*, Warszawa 2007.

Mahan K., Escott-Stump S., *Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy*, Philadelphia 2000.

Guthrie H.A., *Introductory Nutrition*, St Louis.

Molleson A.L., Gallagher-Allred C.R., *Normal Diet: Geriatrics. Nutrition in Primary Care*, Columbus 1980.

NETOGRAFIA

Materiały edukacyjne The University of Texas, Health Science Center, San Antonio, USA <http://teachhealthk-12.uthscsa.edu>.

3. Węglowodany i ich metabolizm

WSTĘP

Składniki odżywcze wchodzące w skład pokarmu pełnią w organizmie funkcje:

- strukturalne: białka, węglowodany, tłuszcze,
- energetyczne: węglowodany, tłuszcze,
- regulacyjne: witaminy, składniki mineralne, a także aminokwasy, węglowodany i kwasy tłuszczowe.

Przeciętnie dorosły człowiek o umiarkowanej aktywności spożywa ok. 70 g białka, 80 g tłuszczu, 400 g węglowodanów, 20 g składników mineralnych, 2 500 g wody, dostarczając przy tym 2 600 kcal.

Węglowodany (cukry, sacharydy) stanowią przede wszystkim źródło łatwo przyswajalnej energii. Glukoza jest cukrem prostym i stanowi podstawowe paliwo energetyczne komórek. Jeżeli nie jest ona wykorzystywana na bieżące potrzeby energetyczne, może ulec przekształceniu w materiał zapasowy, którym jest glikogen produkowany w wątrobie oraz mięśniach. Z glukozy powstają także aminokwasy glikogenne i/lub triacyloglicerole odkładane w tkance tłuszczowej.

Węglowodany powinny dostarczać pomiędzy 45% a 60% dziennego zapotrzebowania energetycznego u dorosłego człowieka. W prawidłowym żywieniu jedynie około 15% węglowodanów powinno pochodzić z cukrów prostych, natomiast główny udział w codziennej racji żywieniowej powinny mieć produkty zawierające węglowodany złożone. Jednym z najcenniejszych źródeł węglowodanów są produkty zbożowe z grubego przemiału, szczególnie kasze. Zawierają one (oprócz skrobi) błonnik pokarmowy nierozpuszczalny, magnez, żelazo, witaminy z grupy B, cynk. Podobnie suche nasiona roślin strączkowych poza skrobią zawierają duże ilości niemal pełnowartościowego białka, a także nienasycone kwasy tłuszczowe, witaminy: B₁, B₂, PP, składniki mineralne:

wapń, fosfor, żelazo oraz rozpuszczalny błonnik pokarmowy. Cennym źródłem błonnika, witamin i mikroelementów są także świeże warzywa i owoce. Rekomendowana ilość włókna pokarmowego w dziennej racji pokarmowej wynosi między 27 a 40 g dziennie.

Tabela 10. Zawartość węglowodanów i błonnika w 100 g produktów spożywczych

Produkt spożywczy	Energia [kcal]	Węglowodany ogółem [g]	Błonnik [g]
Bób	66	14,0	5,8
Bułki grahamki	258	56,9	5,4
Bułki maślane	326	61,8	2,0
Bułki pszenne	272	58,5	2,1
Buraki	34	7,1	1,6
Cebula	33	6,1	1,5
Chleb mieszany, pszenno-żytni	203	43,7	2,7
Chleb pszenny razowy, graham	198	40,0	5,0
Fasola biała, ziarno suche	346	61,6	15,7
Gruszka	47	10,9	1,6
Jabłko	42	8,8	1,3
Kapusta biała	32	6,2	2,1
Kasza gryczana	336	69,3	5,9
Kasza manna	348	76,7	2,5
Makaron dwujajeczny	364	72,0	5,3
Marchew	25	5,4	1,5
Mąka pszenna poznańska (typ 500)	347	74,9	2,6
Ogórek	11	2,1	0,4
Otręby	185	61,9	42,4
Pomarańcza	37	8,1	1,4
Pomidor	28	5,0	1,2
Porzeczki czarne	81	16,9	7,7
Ryż biały	349	78,9	2,4
Ryż brązowy	322	76,7	8,7
Soja	382	32,7	15,7
Suszone śliwki	267	68,9	9,4
Zielony groszek	75	17,0	6,0
Ziemniaki	59	13,5	0,8

*Produkty suche po namoczeniu i ugotowaniu mają niższą zawartość składników odżywczych w przeliczeniu na 100 g ze względu na wchłonięcie dużej ilości wody.

Źródło: na podstawie H. Kunachowicz, *et al*, *Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych i potraw*, Warszawa 2005.

NAJWAŻNIEJSZE WĘGLOWODANY W DIECIE CZŁOWIEKA:**Węglowodany proste (monosacharydy)**

- Glukoza – inaczej cukier gronowy, jest podstawowym związkiem energetycznym dla żywych organizmów, jak również substratem do biosyntezy. W naturze występuje powszechnie. Ilość glukozy np. w owocach zależy od gatunku i stopnia ich dojrzałości.
- Fruktaza – czyli cukier owocowy, jest izomerem glukozy, jednak jest metabolizowana znacznie wolniej niż glukoza. Jej obecność nie wpływa znacząco na indeks glikemiczny potraw, jednak również powoduje wydzielanie insuliny. Występuje głównie w owocach i miodzie.
- Galaktoza i mannoza zazwyczaj nie występują w stanie wolnym, ale są składnikami wielocukrów, glikolipidów i glikoprotein.
- Ryboza i deoksyryboza – w odróżnieniu od wyżej wymienionych heksoz, są to cukry zbudowane z pięciu atomów węgla. Wchodzą w skład nukleotydów i kwasów nukleinowych.

Węglowodany złożone**A) Oligosacharydy – cukry złożone o stosunkowo małej masie cząsteczkowej****Disacharydy (dwucukry)**

- Sacharoza (cukier buraczany, trzcinowy) – składa się z cząsteczek glukozy i fruktozy. Cukier krystaliczny, biały, powszechnie używany do słodzenia żywności. Uzyskiwany jest przez rafinację soku z buraka cukrowego lub trzciny cukrowej. W przemyśle spożywczym stosuje się często cukier inwertowany, czyli mieszankę fruktozy i glukozy powstałą z hydrolizy sacharozy, który nie ulega krystalizacji. Cukier brązowy nierafinowany zawdzięcza swoją barwę melasie. Często producenci barwią biały cukier rafinowany karmelem, by uzyskać tańszy substytut.
- Laktoza (cukier mleczny) – składa się z cząsteczek glukozy i galaktozy. Występuje w mleku i produktach mlecznych (w ludzkim mleku ok. 7%, krowim ok. 5%). U ludzi nieposiadających laktazy (enzymu, który bierze udział w trawieniu tego cukru) lub z upośledzonym jego wytwarzaniem – występują objawy nietolerancji laktozy. Ponad 1/3 populacji w Polsce nie wytwarza tego enzymu. Dlatego zalecane jest spożywanie fermentowanych produktów mlecznych, takich jak: jogurt, kefir, maślanka, sery żółte, ponieważ podczas procesu fermentacji laktoza jest rozkładana przez bakterie kwasu mlekowego.
- Maltoza (cukier słodowy) – zbudowana z dwóch cząsteczek glukozy. Maltoza powstaje w procesie fermentacji ziaren zbóż, występuje

w piwie oraz produktach piekarniczych. Jej spożycie powoduje szybkie podniesienie poziomu glukozy we krwi.

Trisacharydy (trójcukry)

- Rafinoza – zbudowana z glukozy, fruktozy i galaktozy. Nie jest trawiona przez układ pokarmowy człowieka, znajduje się w roślinach strączkowych (np. groch, fasola). Jej obecność w żywności bywa przyczyną wzdęć.

B) Polisacharydy – wielocukry – wielocząsteczkowe polimery zbudowane z cząsteczek cukrów prostych i pochodnych cukrowców

- Skrobia – główny materiał zapasowy roślin. W zbilansowanej diecie jej spożycie dostarcza prawie 25% całkowitej dziennej energii. Żywność zawierająca skrobię daje uczucie sytości, na długo zmniejszając uczucie głodu. W stanie surowym jest trudno strawna, dopiero pęcznienie w wilgotnym środowisku i obróbka termiczna sprawiają, że staje się dostępna dla enzymów trawiennych. Rozkładana jest wtedy na rozpuszczalne w wodzie i łatwiej strawne dekstryny, zawierające do około 30 cząstek glukozy. Skrobię zawierają np. ziarna zbóż (75%), ziemniaki (20%), kukurydza (80%), nasiona roślin strączkowych (40%).
- Glikogen – węglowodan zapasowy organizmów zwierzęcych i drożdży. Glikogen w organizmie jest rozkładany do glukozy. Występuje w wątrobie, mięśniach, nerkach, mózgu i płytkach krwi. Ma strukturę podobną do skrobi, jednak w o wiele większym stopniu rozgałęzioną. Glikogen mięśniowy jest wykorzystywany do dostarczania energii na pracę mięśni, natomiast glikogen zawarty w wątrobie jest bezpośrednim źródłem glukozy, służącym do utrzymania stałego jej poziomu we krwi.
- Celuloza – wchodzi w skład włókna pokarmowego i nie jest trawiona przez organizm człowieka (brak enzymu celulazy). Stanowi element struktury ścian komórkowych – roślin. Jest zbudowana z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi. Zapobiega zaparciom, przeciwdziała powstawaniu nowotworów przewodu pokarmowego, obniża poziom glukozy we krwi oraz hamuje przyrost masy ciała.
- Hemicelulozy – wielocukrowce zbudowane z arabinozy, ksylozy i kwasu glikuronowego, nierozpuszczalne w wodzie, wchodzące w skład ścian komórkowych lub materiału zapasowego roślin.
- Inulina – występuje w bulwach georginii, topinamburu, w mniszku lekarskim, karczochach, cykorii. Jest polimerem fruktozy. Nie jest trawiona przez człowieka, natomiast jako prebiotyk stanowi substrat do rozwoju endogennej flory jelitowej.

- Agar-agar i karagen – pochodzą z glonów morskich, zbudowane z podjednostek galaktozy, są wykorzystywane do przygotowywania wegańskich galaretek. Te galaktany nie są trawione przez człowieka.
- Pektyny (z owoców) to polisacharydy – wykorzystywane w przemyśle spożywczym jako substancje zagęszczające lub stabilizatory.

Dodatkowo w pokarmie człowieka znajdują się cukrowce zmodyfikowane połączone z innymi grupami chemicznymi lub związkami.

Błonnik pokarmowy (włókno pokarmowe) – grupa związków roślinnych opornych na działanie enzymów trawiennych przewodu pokarmowego człowieka. W jej skład wchodzi celuloza i polisacharydy niecelulozowe (hemicelulozy, pektyny, gumy i kleje, polisacharydy roślin morskich np. alginiany, agar, karageny) oraz ligniny. Do grupy tej jest zaliczana także oporna na trawienie skrobia, która nie występuje w naturze, ale powstaje podczas ogrzewania produktów skrobiowych w niedostatecznej ilości wody, np. podczas produkcji płatków śniadaniowych.

- Włókno pokarmowe nierozpuszczalne w wodzie (celuloza, hemiceluloza, ligniny) jest to część pożywienia pochodzenia roślinnego, której nasz organizm nie trawi, lecz jest ona potrzebna m.in. do prawidłowego przebiegu procesów trawienia. Włókna nierozpuszczalne przyspieszają przechodzenie treści pokarmowej przez jelita, stymulując ruchy perystaltyczne jelit, wspomagając proces trawienia i zapobiegając zaparciom. Pęcznienie błonnika w układzie pokarmowym zapewnia uczucie sytości. Włókna pokarmowe wspomagają rozwój symbiotycznej jelitowej flory bakteryjnej i zwiększają usuwanie cholesterolu i metali z organizmu.
- Włókno pokarmowe rozpuszczalne w wodzie (pektyny, polisacharydy roślin morskich, gumy i kleje roślinne) rozkładane jest niemal w całości przez florę bakteryjną jelit, a częściowo wykorzystywane przez organizm człowieka. Pęcznieje w świetle jelita cienkiego, tworzy lepkie żele, zwalnia czas pasażu jelitowego (pomaga w leczeniu biegunek) oraz działa odtruwająco na organizm dzięki zdolnościom wychwytywania toksyn bakteryjnych i jonów metali ciężkich. Ma także wpływ na gospodarkę lipidową (spowalnia absorpcję trójglicerydów oraz zwiększa wydalanie cholesterolu i tłuszczów z kałem), opóźnia także tempo wchłaniania glukozy do krwioobiegu. Frakcjom błonnika rozpuszczalnego w wodzie przypisuje się właściwości zapobiegania chorobom układu krążenia.

Tabela 11. Zawartość błonnika (g) na 100 g produktu

Produkty zbożowe	Zawartość błonnika	Warzywa	Zawartość błonnika	Owoce	Zawartość błonnika
Otręby pszenne	42,3	Fasola biała	15,8	Morele suszone	10,4
Płatki owsiane	6,9	Groszek zielony	5,8	Śliwki suszone	8,0
Płatki kukurydziane	6,5	Brukselka	4,1	Maliny	6,7
Pumpernikiel	6,4	Marchew	2,7	Rodzynki	6,5
Pieczywo chrupkie	6,3	Kapusta biała	2,1	Czarne porzeczki	4,8
Bułka grahamka	5,4	Szpinak	2,1	Kiwi	1,8
Chleb żytni	5,0	Burak	1,7	Truskawki	1,7
Chleb pszenny	4,5	Kalafior	1,5	Gruszki	1,6
Bułka zwykła	2,2	Pomidor	1,2	Jabłka	1,5
Kasza jęczmienna	1,8	Ziemniak	1,2	Winogrona	1,5
Makaron	1,6	Szparagi	1,1	Banany	1,1
Ryż gotowany	1,0	Salata	1,0	Pomarańcze	1,0
Kasza manna	0,7	Ogórek	0,4	Arbuz	0,2

Źródło: opracowano na podstawie H. Kunachowicz, *et al*, *Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych i potraw*, Warszawa 2005.

METABOLIZM GLUKOZY

Glukoza jest podstawowym źródłem energii dla komórek, dlatego konieczne jest utrzymywanie jej stałego poziomu we krwi. Jest to szczególnie ważne dla czerwonych krwinek i komórek mózgu, dla których glukoza stanowi wyłączone źródło energii. Optymalne stężenie glukozy we krwi waha się pomiędzy 4 a 8 mM (70–140 mg/dl). W regulacji poziomu glukozy biorą udział hormony trzustki: insulina i glukagon oraz adrenalina – hormon nadnerczy.

W sytuacji niewystarczającej podaży węglowodanów z pokarmem, w wątrobie uruchamiany zostaje proces glikogenolizy, czyli rozpadu zmagazynowanego tam glikogenu do glukozy. Należy pamiętać, iż glikogen mięśniowy jest używany jedynie miejscowo – jako źródło energii dla komórek mięśniowych, nie wpływając na regulację stężenia glukozy we krwi.

Przy wysokim spożyciu węglowodanów, po zaspokojeniu potrzeb energetycznych organizmu, ich nadmiar wykorzystywany jest do syntezy triacylogliceroli, które mogą odkładać się w tkance tłuszczowej.

Stężenie glukozy we krwi ma ścisły związek z metabolizmem tłuszczów i białek. Przy zbyt niskim poziomie spożycia węglowodanów tłuszcze są niecałkowicie spalane. W konsekwencji prowadzi to do nagromadzenia się ciał ketonowych: acetonu, aceto-octanu, beta-hydroksymaślanu, produktów metabolizmu kwasów tłuszczowych w ustroju. Chroniczny brak węglowodanów w pożywieniu może prowadzić do kwasicy ketonowej (ketonemii i ketonurii). Przy niedoborach węglowodanów (głód, intensywny wysiłek fizyczny) uaktywniony zostaje proces glukoneogenezy, czyli produkcji glukozy z aminokwasów i glicerolu.

Zjedzenie każdego pokarmu zawierającego węglowodany powoduje podniesienie stężenia glukozy we krwi powyżej stężenia optymalnego. Odpowiedzią organizmu jest natychmiastowe uwalnianie do krwiobiegu insuliny z komórek β wysepek Langerhansa trzustki. Hormon ten umożliwia komórkom wchłanianie glukozy, co w konsekwencji obniża stężenie glukozy we krwi do optymalnego poziomu. Ponadto insulina działa anabolicznie, stymulując syntezę kwasów tłuszczowych i odkładanie ich w adipocytach. Efektywność działania insuliny jest uzależniona od obecności odpowiednich receptorów na powierzchni komórek. W komórkach glukoza wchodzi w szlak metaboliczny zwany glikolizą. Niewystarczająca produkcja insuliny przez trzustkę, bądź niedostateczna ilość sprawnych receptorów insulinowych, powoduje, że stężenie glukozy we krwi utrzymuje się na bardzo wysokim poziomie, a wewnątrz komórek występuje niedobór. Ta nieprawidłowość prowadzi do stanu chorobowego zwanego cukrzycą.

W zdrowym organizmie w krótkim czasie po posiłku, kiedy zapasy glukozy zostaną już zagospodarowane przez komórki, stężenie glukozy w krwioobiegu normuje się i produkcja insuliny zmniejsza się. Gdy stężenie glukozy obniży się poniżej normowego poziomu, z komórek alfa wysepek Langerhansa trzustki następuje uwalnianie glukagonu. Hormon ten aktywuje enzymy rozkładające glikogen wątrobowy, uwalniając glukozę do krwioobiegu, a tym samym przywraca jej optymalne stężenie we krwi. Gdy głodzenie trwa długo i zapasy glikogenu w wątrobie wyczerpują się, glukagon stymuluje glukoneogenezę i glukoza produkowana jest np. z aminokwasów. Aminokwasy te pochodzą ze zdegradowanych białek mięśniowych. Oznacza to, że długotrwała głodówka prowadzi do zaniku mięśni.

TEST TOLERANCJI GLUKOZY

Test tolerancji glukozy ma na celu ocenę szybkości normalizacji stężenia glukozy we krwi. Polega on na podaniu badanej osobie doustnie lub dożylnie określonej ilości glukozy, a następnie pomiarze stężenia glukozy we krwi włosniczkowej lub żyłnej w określonych odstępach

czasu. Pierwszego pomiaru dokonuje się na czczo po przynajmniej 6-godzinny głodzeniu. Następnie podaje się 50 g glukozy (lub w dawce 1g glukozy na kg masy ciała). Stężenie glukozy we krwi mierzy się po 30, 60 i 120 min od podania. Prawidłowe stężenie glukozy we krwi na czczo wynosi około 4–5,6 mM (70–100 mg/dl). W pół do jednej godziny po spożyciu posiłku stężenie glukozy we krwi wzrasta do 8–9 mM (140–160 mg/dl). Po dwóch godzinach od podania glukozy jej stężenie we krwi zwykle wraca do wartości prawidłowych ok. 6,1 mM (110 mg/dl), czasem nieznacznie niższych niż stężenie początkowe. Przebieg krzywej spadku stężenia glukozy we krwi obrazuje tolerancję organizmu na glukozę. Zmniejszona tolerancja na glukozę charakteryzuje się szybkim przyrostem jej stężenia we krwi, które osiąga wartości przekraczające dopuszczalne normy, a następnie powolnym powrotem do wartości wyjściowej. Taki przebieg ma krzywa glukozowa np. u osób z cukrzycą, otyłych, nieaktywnych fizycznie, przy nadczynności przysadki mózgowej i nadnerczy, w chorobach trzustki oraz wątroby. Tolerancja glukozy zmniejsza się wraz z wiekiem oraz w czasie ciąży.

Sygnałem ostrzegającym o nieprawidłowym metabolizmie węglowodanów jest stężenie glukozy wyższe niż 7,0 mM (125 mg/dl) mierzone na czczo lub, gdy mierzone o dowolnej porze dnia wynosi powyżej 11,1 mmol/l (200 mg/dl). W takim przypadku należy skonsultować się z lekarzem w celu przeprowadzenia dalszych badań.

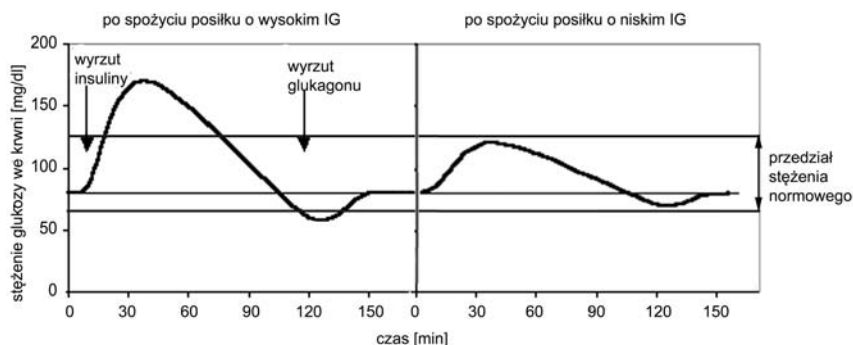
WSKAŹNIK GLIKEMICZNY

Indeks glikemiczny (IG) określa zdolność każdego produktu zawierającego węglowodany do podwyższania poziomu glukozy we krwi. Oblicza się go, dzieląc stężenie glukozy we krwi po przeprowadzeniu testu żywnościowego z udziałem 50 g węglowodanów zawartych w danym produkcie przez poziom glukozy uzyskany po spożyciu 50 g czystej glukozy. Im wyższy poziom glukozy we krwi po spożyciu węglowodanowego produktu, tym wyższy jest jego IG. Glukozie przyznano IG równy 100. IG wyznaczany jest empirycznie dla poszczególnych produktów po ich spożyciu przez zdrowe osoby.

Zwykle zjedzenie produktu węglowodanowego o wysokim IG doprowadza do gwałtownego skoku poziomu cukru we krwi, który wywołuje w odpowiedzi intensywny wyrzut insuliny z trzustki. Poziom glukozy szybko ulega obniżeniu zwykle do wartości niższej niż wyjściowa (hipoglikemia), wywołując uczucie głodu. Oznacza to, że produkty o wysokim IG sprzyjają odkładaniu się tkanki tłuszczowej, ponieważ uczucie głodu prowadzi do częstszego podjadania. Efekt ten jest także związany z anabolicznym działaniem insuliny.

Produkty spożywcze, których IG nie przekracza 50, to produkty o niskim IG. Ich spożywanie powoduje, że glukoza jest powoli wchłaniana do krwiobiegu i w konsekwencji poziom glukozy we krwi rośnie umiarkowanie.

Rycina 4. Porównanie zmian stężenia glukozy we krwi po spożyciu produktów o wysokim i niskim indeksie glikemicznym.



Źródło: opracowanie własne autorów.

Przetwarzanie żywności zawierającej węglowodany podwyższa jej IG. Jabłko zjedzone w całości ma znacznie niższy IG niż to samo jabłko starte na mus. Ponadto IG produktów żywnościowych spożywanych w naturalnej postaci jest znacznie niższy niż IG tych samych produktów poddanych obróbce termicznej (gotowanie, pieczenie, smażenie). Surowa marchew ma IG około 30, natomiast gotowana marchewka ma IG równe aż 85. Ważna jest również intensywność obróbki, np. makaron ugotowany *al dente* ma IG 45, natomiast IG tego samego makaronu po rozgotowaniu wynosi 65. Niski IG mają pełnoziarniste płatki zbożowe i pieczywo z mąki z pełnego przemiału, w porównaniu z bardzo wysokim IG pieczywa białego. Wynika to z faktu, iż obróbka termiczna oraz mechaniczna powodują częściowy rozkład skrobi, w związku z tym proces jej trawienia jest krótszy. Ponadto produkty niskoprzetworzone zawierają więcej błonnika, witamin i pierwiastków śladowych, które mają zdolność obniżania wysokiego poziomu glukozy we krwi. Zrównoważona dieta także sprzyja obniżeniu IG. Wynika to z faktu, że tempo wchłaniania węglowodanów do krwi jest niższe w obecności białek i tłuszczów. Na przykład w przypadku spożycia samego makaronu IG wynosi 60, jeśli jednak makaron jest częścią zbilansowanego posiłku, jego IG może spaść do 30.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL

Wyznaczenie krzywej cukrowej dla glukozy i kilku produktów spożywczych o różnym IG.

WYKONANIE ĆWICZENIA:

Do wykonania zadania potrzebny jest glukometr paskowy.

Każda osoba przystępująca do zajęć nie powinna niczego jeść ani pić słodzonych napojów przez przynajmniej cztery godziny przed zajęciami.

Przed rozpoczęciem zadania należy dokładnie umyć ręce ciepłą wodą. Palec, z którego będzie pobierana krew, należy zdezynfekować wacikiem nasączonym alkoholem i poczekać aż wyschnie. Należy posługiwać się profesjonalnym nakłuwaczem z jednorazowymi ostrzami. Koniecznie należy usunąć zużyty nożyk, zabezpieczyć jego ostrze i wyrzucić do oznakowanego pojemnika.

Glukometr należy obsługiwać zgodnie z instrukcją. Za każdym razem należy nakłuwać palec w innym miejscu lub pobierać krew z innych palców.

Zadanie 1: Wykonać pomiar stężenia glukozy we krwi na czczo. $\frac{1}{3}$ grupy (wybrane losowo osoby) sporządza krzywą tolerancji glukozy po spożyciu 50 g czystej glukozy. Druga część grupy bada zależność poziomu glukozy we krwi po spożyciu wylosowanego produktu żywnościowego o niskim IG zawierającego 50 g węglowodanów. Pozostała część grupy analizuje zmiany stężenia glukozy we krwi po spożyciu produktu żywnościowego o wysokim IG, w takiej ilości, która zawiera 50 g węglowodanów.

Po spożyciu wybranego produktu należy zacząć odmierzanie czasu. Ponowić pomiar glukometryczny po 30 min, po godzinie i po dwóch godzinach od momentu spożycia.

Sporządź wykres przebiegu krzywych cukrowych dla osób z każdej grupy. Porównaj i skomentuj uzyskane wyniki.

Proponowane produkty żywnościowe: świeży sok z marchwi, słodzony sok marchwiowy przecierowy, 50 g glukozy w wodzie, woda mineralna, napój typu cola.

Zadanie 2: Uszereguj, zgodnie z własnym przeświadczeniem, wymienione niżej produkty żywnościowe według wzrastającego IG:

bagietka, banany, bułka biała wysokoocyszczona (do hamburgerów), chipsy, chleb pełnoziarnisty, chleb razowy, frytki, glukoza, gorzka czekolada 70% kakao, kukurydza gotowana, makaron biały ugotowany *al dente*, makaron biały ugotowany na miękko, makaron razowy, marchewka gotowana, marchewka surowa, mąka ziemniaczana, miód, mleko, piwo, płatki kukurydziane, piure ziemniaczane, rodzynki, ryż biały, ryż dziki, sok owocowy niesłodzony, suszona fasola, suszone morele, świeże morele, winogrona, zielone warzywa, ziemniaki gotowane, ziemniaki pieczone.

Kolejność ułożoną przez siebie porównaj z tabelą IG zamieszczoną w załączniku nr 3 (Indeks glikemiczny – tabela).

Zadanie 3: Podczas oczekiwania na kolejne pomiary, korzystając z Internetu, zbierz jak najwięcej wiadomości na temat cukrzycy II typu (insulinozależna), o sposobach jej zapobiegania i leczenia oraz zasadach żywieniowych dla osób chorych na cukrzycę typu II.

Czym różni się cukrzyca typu II od cukrzycy typu I (insulinozależnej)?

Zadanie 4: Odszukaj informacje, jakie substancje są używane do słodzenia żywności zamiast cukru. Znajdź dane o ich wpływie na zdrowie oraz w jaki sposób substancje słodzące wpływają na wydzielanie insuliny przez trzustkę. Sformułuj wnioski o bezpieczeństwie stosowania słodzików oraz określ grupy osób, dla których ich użycie byłoby lub nie byłoby wskazane.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Kozłowski S., Nazar K., *Wprowadzenie do fizjologii klinicznej*, Warszawa 1999.

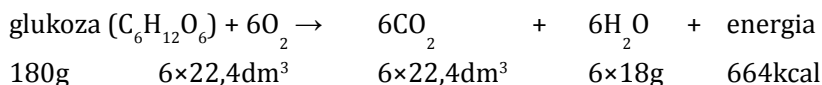
4. Wydatek energetyczny podczas wysiłku fizycznego

WSTĘP

Bilans energetyczny dorosłego zdrowego człowieka powinien wynosić 0, czyli ilość energii pobranej z pożywieniem powinna być równa energii wydatkowanej po uwzględnieniu strat energii z moczem i kałem. Tradycyjnie jednostką używaną w odniesieniu do bilansu energetycznego są kilokalorie [kcal].

1 kaloria [cal] to ilość ciepła potrzebna do ogrzania 1 g wody chemicznie czystej o 1°C od temperatury 14,5 °C do 15,5 °C, przy ciśnieniu 1 atmosfery. W jednostkach układu SI energię wyraża się w dżulach [J], a 1 cal = 4,1855 J.

Składniki pokarmowe w organizmie ulegają w procesach katabolicznych utlenieniu do dwutlenku węgla i wody. Podczas tych procesów generowana jest energia. 1 g węglowodanów dostarcza około 4 kcal, 1 g tłuszczu dostarcza 9 kcal, natomiast 1 g białka dostarcza 4 kcal.

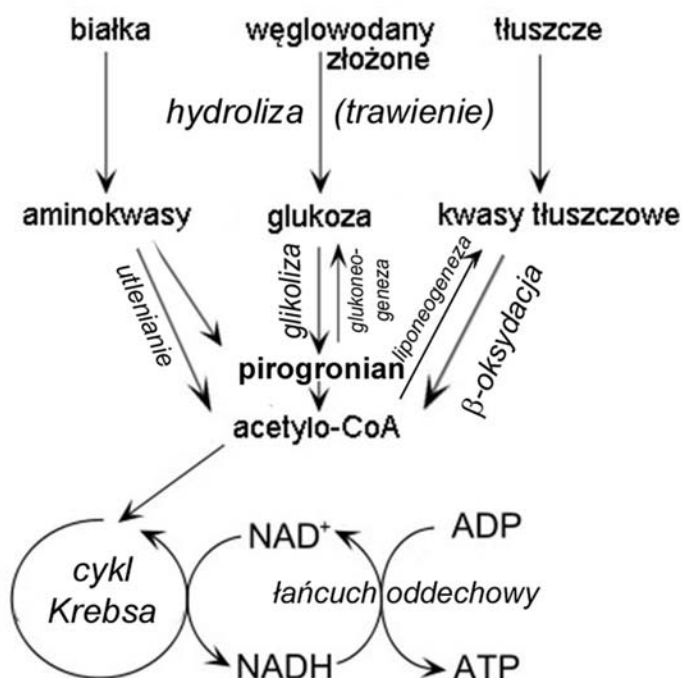


Energia użyteczna dla komórek powstaje w wyspecjalizowanych półautonomicznych organellach – mitochondriach. Głównym związkiem wysokoenergetycznym jest adenozynotrójfosforan (ATP). Powstaje on w procesach fosforylacji, tzn. przyłączenia grupy fosforanowej do adenozynodifosforanu (ADP). W ludzkim metabolizmie dominują dwa typy fosforylacji: substratowa (substratem jest kreatyna) i oksydacyjna (w łańcuchu oddechowym w mitochondriach).

Do procesów, w których powstaje ATP zaliczamy:

- glikolizę (spalanie glukozy),
- β -oksydację kwasów tłuszczowych,
- cykl Krebsa (cykl kwasu cytrynowego),
- łańcuch oddechowy (fosforylacja oksydacyjna),
- defosforylację kreatyny (fosforylacja substratowa),

Rycina 5. Uproszczony schemat procesów katabolicznych w organizmie



Źródło: opracowanie własne autorów.

Organami, które w stanie spoczynku organizmu zużywają najwięcej energii, są: wątroba, mózg, serce i nerki. W czasie wysiłku fizycznego najwięcej energii zużywają mięśnie szkieletowe. Są one zbudowane z włókien mięśniowych poprzecznie prążkowanych (miofibryle), które mają zdolność kurczenia się. Podstawową jednostką czynnościową miofibryli jest sarkomer złożony z kompleksu kilkunastu białek, które tworzą dwie podstawowe grupy filamentów: filamenty grube, składające się z miozyny i fityny, oraz filamenty cienkie, składające się z aktyny, troponiny i tropomiozyny.

Tabela 12. Bilans energetyczny metabolizmu tlenowego jednej cząsteczki glukozy

Proces	Lokalizacja	Zysk (liczba cząsteczek ATP)	Potencjał redukcyjny
Glikoliza	Cytoplazma	2	2NADH
Dekarboksylacja pirogronianu	Błona mitochondrium		2NADH
Cykl Krebsa	Matriks mitochondrium	2 (GTP)	6NADH 2FADH
Fosforylacja oksydacyjna	Błona wewnętrzna mitochondrium	32	
SUMA		36	

W czasie skurczu filamety cienkie są wciągane pomiędzy filamety grube. W obecności Ca^{2+} miozyna hydrolizuje ATP do ADP i P_i uwalniając energię potrzebną do skurczu mięśni.

Energia do wykonywania ćwiczeń fizycznych jest wytwarzana zarówno w procesie spalania kwasów tłuszczowych, jak i tlenowego spalania glukozy uwolnionej z glikogenu mięśniowego. Analiza bilansu biegu maratończyka (42 km 195 m) pokazuje, że na pokonanie tak długiego dystansu (ok. dwóch godzin) organizm musi zużyć około 150 moli ATP. Gdyby cały zgromadzony w mięśniach glikogen został spalony, powstałyby z niego około 103 mole ATP. Brakującą ilość energii dostarczy utlenienie uwalnianych z tkanki tłuszczowej kwasów tłuszczowych. Kwasy tłuszczowe nie mogą być jedynym źródłem energii, gdyż proces ich spalania w organizmie jest bardzo wolny (6,7 mmole ATP/s, tabela 13). Oznacza to, że gdyby były one jedynym źródłem energii koniecznej do pokonania 42 km maratońskiego biegu, to cały bieg musiałby trwać 6 godzin. A ponieważ maratończycy ten dystans pokonują w czasie trzykrotnie szybszym, jest to dowód na to, że ich organizm czerpie energię także ze znacznie wydajniejszego utleniania glikogenu (16,7 mmola ATP/s).

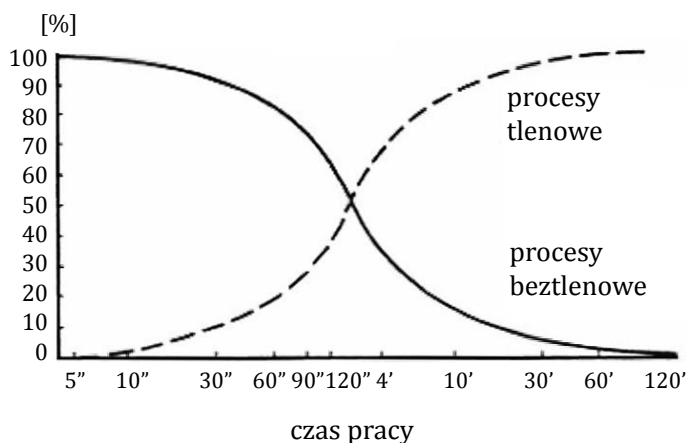
Tkanka tłuszczowa spala się, gdy systematycznie uprawiamy nieforujące ćwiczenia aerobowe (tlenowe), w czasie których pobierana jest wystarczająca ilość powietrza do płuc, z których tlen krwioobiegem dostaje się do mięśni. Spalanie kwasów tłuszczowych wymaga bowiem ciągłej obecności tlenu. Podczas bardzo intensywnego wysiłku zwykle tlen nie jest dostarczany z odpowiednią szybkością, w tej sytuacji glukoza ze zgromadzonego w mięśniach glikogenu jest rozkładana w procesie beztlenowym. Jest to bardzo szybki sposób uzyskiwania energii (39,1 mmol ATP/s), ale krótkotrwały (ok. 2 min). Powstający w tym

procesie kwas mlekowy powoduje „zakwaszenie” mięśni. Przykładem wykorzystania tego procesu jest bieg na 100 m, który trwa mniej niż 10 s. Oznacza to, że sprinter cały ten dystans w 85% pokonuje dzięki procesom beztlenowym: glikolizie i defosforylacji fosfokreatyny (tabela 13).

Tabela 13. Szybkość produkcji ATP w procesach aerobowych i anaerobowych

Procesy tlenowe	Szybkość produkcji ATP [mmol/s]
Glikogenoliza w wątrobie	6,2
β -oksydacja kwasów tłuszczowych	6,7
Glikogenoliza w mięśniach	16,7
Procesy beztlenowe	
Glikoliza do mleczanu	39,1
Przeniesienie fosforanu z fosfokreatyny	73,3

Rycina 6. Procentowy udział procesów tlenowych i beztlenowych w czasie trwania wysiłku fizycznego



Źródło: opracowano na podstawie: J.S. Keller, *Zarys bioenergetyki człowieka. Homeostaza organizmu dorosłego*, Warszawa 1996.

Wysiłek fizyczny definiujemy jako pracę mięśni oraz całokształt zmian czynnościowych w organizmie, które towarzyszą tej pracy.

Wysiłek fizyczny dzielimy na:

- wysiłek ogólny, kiedy pracuje więcej niż 30% całkowitej masy mięśniowej,
- wysiłek miejscowy, kiedy bierze w nim udział mniej niż 30% masy mięśni.

W zależności od intensywności pracy mięśniowej, której miarą jest ilość wydatkowanej energii w jednostce czasu (czyli moc), wysiłki dzielimy na: lekkie, średnio ciężkie i bardzo ciężkie.

intensywność pracy mięśniowej = ilość wydatkowanej energii / czas

Odczucie związane z intensywnością wysiłku potrzebnego do wykonania pracy, czyli tzw. stopień ciężkości pracy oraz obciążenie czynnościowe mięśni podczas wysiłku dynamicznego ogólnego, jest zależne od tzw. obciążenia względnego. Obciążenie względne mierzone jest stosunkiem zapotrzebowania na tlen podczas wykonywania pracy a maksymalną zdolnością pochłaniania tlenu przez organizm ($V_{O_2 \max}$) i wyrażone jest w procentach.

$$\text{ciężkość pracy} = \text{obciążenie względne} = \frac{\text{zapotrzebowanie na tlen podczas wysiłku}}{\text{maksymalna zdolność pochłaniania tlenu}} \times 100\%$$

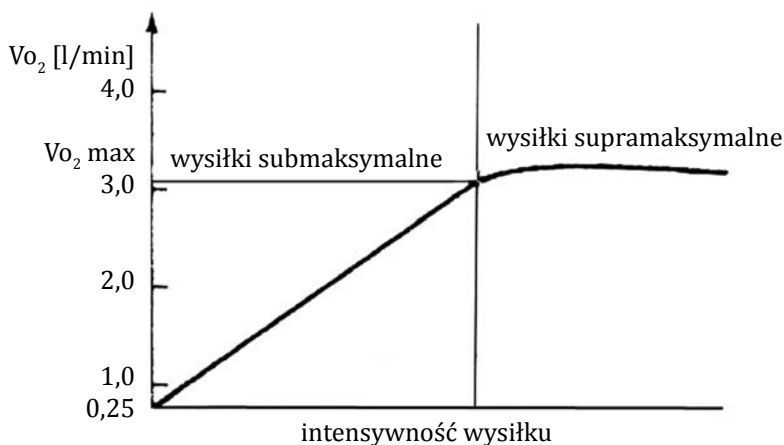
Wysiłek maksymalny to taki, kiedy zapotrzebowanie na tlen jest równe $V_{O_2 \max}$.

Wysiłek supramaksymalny to taki, kiedy zapotrzebowanie na tlen jest większe niż $V_{O_2 \max}$.

Obydwa rodzaje wysiłków mogą być wykonywane nie dłużej niż kilka minut.

Wysiłek submaksymalny to taki, kiedy zapotrzebowanie na tlen jest mniejsze niż $V_{O_2 \max}$, w zależności od intensywności może być wykonywany nawet kilka godzin. Jeżeli zapotrzebowanie na tlen podczas wysiłku stanowi 10–15% $V_{O_2 \max}$, to taki wysiłek jest klasyfikowany jako wysiłek lekki. Wysiłek ciężki charakteryzuje zapotrzebowanie na tlen w granicach: 30–40% $V_{O_2 \max}$, natomiast wysiłek bardzo ciężki oznacza wzrost zapotrzebowania na tlen powyżej 50% maksymalnej zdolności jego pochłaniania przez organizm.

Rycina 7. Zależność między intensywnością pracy a pochłanianiem tlenu przez organizm (V_{O_2})



Źródło: opracowano na podstawie: J.S. Keller, *Zarys bioenergetyki człowieka...*, op. cit.

ZUŻYCIE TLENU PODCZAS WYSIŁKU:

W pierwszej minucie wysiłku następuje:

- 1) zwiększenie pobierania tlenu (zwiększenie wentylacji płuc),
- 2) zwiększenie ogólnego przepływu krwi (objętość minutowa serca),
- 3) zwiększenie wychwytywania tlenu z krwi przepływającej przez mięśnie.

Po 2–5 min pracy pobieranie tlenu osiąga poziom odpowiadający zapotrzebowaniu (w przypadku wysiłku submaksymalnego) lub poziom maksymalny (podczas wysiłku maksymalnego lub supramaksymalnego).

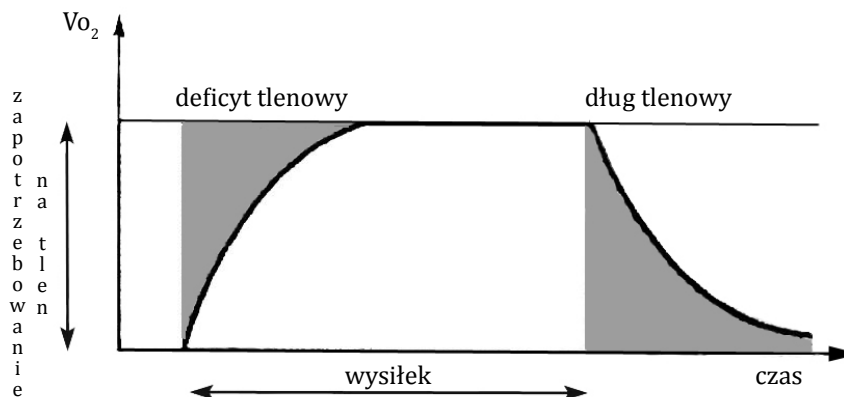
Stan równowagi czynnościowej to stan, w którym pobieranie tlenu odpowiada zapotrzebowaniu organizmu na jego dostarczenie.

W stanie równowagi czynnościowej pobieranie tlenu wykazuje liniową zależność od intensywności pracy (wydatku energii), niemal do poziomu obciążeń maksymalnych.

Przed osiągnięciem równowagi czynnościowej występuje tzw. deficyt tlenowy, czyli niedobór tlenu w stosunku do zapotrzebowania na niego. W tym czasie, podobnie jak w czasie wysiłków supramaksymalnych, znaczna część energii jest uzyskiwana na drodze procesów beztlenowych. Natomiast po zakończeniu pracy zużycie tlenu szybko się zmniejsza, ale przez pewien czas jest ono ciągle większe niż przed wy-

siłkiem. W tym czasie odbudowywane są zapasy kreatyny i glikogenu oraz zachodzi przemiana kwasu mlekowego w glukozę. Nadwyżkę pobierania tlenu nad zapotrzebowanie po zakończeniu pracy nazywa się długiem tlenowym.

Rycina 8. Intensywność pobierania tlenu w trakcie i po zakończeniu wysiłku fizycznego



Źródło: opracowano na podstawie: J.S. Keller, *Zarys bioenergetyki człowieka...*, op. cit.

WYDOLNOŚĆ FIZYCZNA:

Wydolność fizyczną definiujemy jako zdolność wykonywania długotrwałej pracy bez wyraźnych objawów zmęczenia. Jest ona zależna od maksymalnej zdolności pobierania tlenu $V_{O_2 \max}$ i jest różna u różnych osób.

wskaźnik wydolności fizycznej = maksymalny pobór tlenu przez organizm w jednostce czasu

Wyróżniamy dwa rodzaje wydolności:

- **ogólna** (podstawowa) – jest to zdolność do wykonywania długotrwałej pracy fizycznej o określonej intensywności bez wyraźnego zmęczenia i głębszych zmian środowiska wewnętrznego
- **specjalna** – jest to zdolność do wykonywania specjalnego rodzaju wysiłku.

Ogólna wydolność fizyczna jest tym wyższa, im cięższą pracę może organizm wykonać oraz im większa jest zdolność pobierania tlenu przez organizm.

Wydolność fizyczna uzależniona jest od:

- energetyki wysiłku,
 - przemian tlenowych (o zdolności do wysiłku decyduje maksymalna ilość tlenu, którą ustrój może pochłoniąć w ciągu minuty);
 - przemian beztlenowych (o zdolności wysiłkowej decyduje tolerancja zaburzeń homeostazy);
 - rezerw energetycznych (zasoby rezerw i sprawność procesów metabolicznych);
- sprawności termoregulacji,
- koordynacji nerwowo-mięśniowej,
- czynników psychologicznych (motywacja).

Wpływ każdego z tych czynników na zdolność pokonywania wysiłków fizycznych zależy od rodzaju wysiłku, intensywności i czasu jego trwania oraz od warunków, w jakich te wysiłki są wykonywane.

Wydolność fizyczną można oznaczyć, mierząc pobór tlenu podczas wysiłku o wzrastającym obciążeniu aż do momentu, w którym pobieranie tlenu nie zwiększa się mimo wzrostu obciążenia, tzn. od **maksymalnej objętości minutowej serca** i sprawności jego funkcji.

ZMIANY CZYNNOŚCIOWE UKŁADU KRĄŻENIA W CZASIE WYSIŁKU:

Sprawne zaopatrywanie mięśni w tlen i w substraty energetyczne wymaga przystosowania czynności układu krążenia do wysiłku. Jest ono związane ze stopniem wytrenowania organizmu.

W czasie wysiłku zwiększa się częstość skurczów serca oraz jego objętość wyrzutowa (ilość pompowanej krwi), a w rezultacie wzrasta objętość minutowa serca, odzwierciedlająca zapotrzebowanie na tlen.

$$\text{objętość minutowa serca} = \text{objętość wyrzutowa serca} \times \text{częstotliwość skurczów serca}$$

Objętość wyrzutowa serca jest równa ilości krwi tłoczonej z serca w czasie każdego skurczu komór. W czasie spoczynku serce ludzkie bije z częstością około 70 uderzeń na min. Zmiana objętości minutowej serca umożliwia dostosowanie czynności serca do zapotrzebowania organizmu na tlen.

Podczas wysiłków submaksymalnych po kilku minutach pracy częstość skurczów serca osiąga stały poziom, na którym utrzymuje się przez dłuższy czas (do ok. godziny), a następnie wykazuje tendencję do dalszego wzrostu. W okresie równowagi czynnościowej częstość skur-

czów serca wykazuje linową zależność od intensywności pracy i pobierania tlenu.

Ciśnienie tętnicze krwi podczas wysiłku wzrasta proporcjonalnie do obciążenia wskutek zwiększenia objętości minutowej serca i skurczu naczyń tętniczych w niektórych obszarach naczyńniowych.

KORZYŚCI PŁYNĄCE Z SYSTEMATYCZNEGO WYSIŁKU FIZYCZNEGO:

- kontrola masy ciała,
- ukształtowanie sylwetki,
- wzmocnienie struktury kości,
- wzrost sprawności mięśni,
- poprawa samopoczucia (endorfiny),
- poprawa samooceny,
- usprawnienie układu krążenia i pracy serca,
- lepsze dotlenienie mózgu, a w konsekwencji poprawa koncentracji i pamięci.

MONITOR PRACY SERCA

Istnieje ścisły związek pomiędzy pobieraniem tlenu w czasie pracy fizycznej a częstością skurczów serca (HR) i jest on zależny od następujących parametrów: wieku, płci, poziomu sprawności oraz masy ciała.

Intensywność pracy mięśniowej mierzona częstotliwością skurczów serca może być wyrażona w kcal (lub kJ).

$$V_{O_2} = SV \times HR \times AVdO_2,$$

gdzie:

SV – objętość wyrzutowa serca

HR – częstość skurczów serca

$AVdO_2$ – różnica tętniczo-żylna wysycenia tlenem (pobieranie tlenu przez tkanki), zróżnicowana osobniczo.

Aby zatem osiągnąć maksimum pobierania tlenu w jednostce czasu, należy osiągnąć maksymalną częstość skurczów serca.

Monitor pracy serca pozwala mierzyć wydolność fizyczną.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Określenie wydatku energetycznego w czasie wykonywania wysiłku fizycznego z wykorzystaniem monitora pracy serca i ciśnieniomierza.

Zadanie 1: Przed przystąpieniem do ćwiczeń zmierz swoje ciśnienie tętnicze za pomocą ciśnieniomierza. Zanotuj:

- ciśnienie skurczowe** (wartość osiągnięta w momencie szczytu wyrzutu krwi z komór serca),
- ciśnienie rozkurczowe** (najniższa wartość ciśnienia tętniczego umożliwiająca utrzymanie ciągłego przepływu krwi),
- tętno** (miejscowe odkształcenie sprężyste tętnicy i towarzyszący temu wzrost ciśnienia, pojawiające się zgodnie ze skurczami serca).

Wykonaj lekkie ćwiczenie fizyczne, np. podnoś obciążone wyprostowane ręce ruchem kolistym od ud ponad głowę w tempie 20 ruchów na min przez ok. 60 s. Natychmiast po wykonaniu ćwiczenia usiądź i ponownie zmierz ciśnienie tętnicze oraz tętno. Zanotuj wyniki.

Na podstawie danych z tabeli 14 ustal wielkość wydatku energetycznego podczas wykonywanego wysiłku.

Tabela 14. Zależność pomiędzy częstotliwością skurczów serca, ilością zużywanej energii a stopniem ciężkości wysiłku fizycznego

Stopień ciężkości wykonywanego ćwiczenia	Energia brutto [kcal/min]	Częstotliwość tętna
Bardzo lekkie	do 2,5	do 75
Lekkie	2,5–5	75–100
Średnie	5–7,5	100–125
Ciężkie	7,5–10	125–150

Zadanie 2: Wyznaczanie zależności wartości wydatku energetycznego od czasu trwania ćwiczenia oraz od intensywności wysiłku. Przed wykonaniem ćwiczenia zapoznaj się z instrukcją obsługi monitora serca, np. typu Polar M22 (załącznik nr 4).

Oblicz dla siebie maksymalną szybkość pracy serca:

$$HR_{\max} = 220 - \text{wiek w latach}$$

lub dla osób wytrenowanych przed 60 rokiem życia skorzystaj ze wzoru wprowadzonego przez Sally Edwards:

Mężczyźni: $HR_{\max} = 210 - \frac{1}{2} \text{ wieku} - 11\% \text{ masy ciała} + 4$

Kobiety: $HR_{\max} = 210 - \frac{1}{2} \text{ wieku} - 11\% \text{ masy ciała}$

Standardowa bezpieczna strefa to zakres od 65 do 80% maksymalnej szybkości pracy serca.

Pomiary będą dokonywane dla 50% i 80% wydajności maksymalnej pracy serca, które każdy w grupie powinien obliczyć dla siebie. Wartości te należy wprowadzać przed każdym pomiarem do pamięci monitora pracy serca.

Ćwiczenia fizyczne (bieżnia, stepper, podskoki na skakance) przeprowadź w okresie 2, 4 i 6 min dla obydwu zakresów wydajności. Zapisz wszystkie wyniki.

Narysuj wykres zależności wydatku energetycznego (kcal) dla 50% i 80% wydajności maksymalnej szybkości pracy serca. Uzasadnij uzyskany wynik.

Od czego zależy udział spalania tkanki tłuszczowej w tym wydatku energetycznym?

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Keller J.S., *Zarys bioenergetyki człowieka. Homeostaza organizmu dorosłego*, Warszawa 1996.

5. Ocena sposobu żywienia

WSTĘP

Do oceny sposobu żywienia konieczne jest zebranie informacji, jakie produkty żywnościowe i w jakich ilościach są spożywane przez badaną osobę lub populację w przeliczeniu na rok, lub 24 godziny. Dane te są wykorzystywane zarówno w badaniach z zakresu medycyny, ekonomii, nauk o żywieniu, jak i przy ocenie polityki żywieniowej danego kraju.

Sposób odżywiania można zanalizować, stosując metody pośrednie, takie jak: metoda bilansów żywnościowych, badająca podaż żywności na rynku (z uwzględnieniem importu i zużycia przez przemysł na cele nieżywniowe), analiza raportów magazynowych (stosowana do badania sposobu żywienia zbiorowego) czy analiza budżetów gospodarstw domowych.

Metody bezpośrednie badania sposobu żywienia są znacznie dokładniejsze i lepiej odzwierciedlają odżywianie badanych osób. Ich celem jest bowiem oszacowanie rzeczywiście spożytej żywności z uwzględnieniem strat występujących podczas obróbki kulinarnej i technologicznej pokarmu. Należą do nich metody analityczne (średnia całodzienniej racji pokarmowej, metoda podwójnej porcji) oraz metody inwentarzowo-zapisujące (zapis wagowy, zapis szacunkowy). Najczęstszym sposobem oceny sposobu żywienia jest prowadzenie ankiet żywieniowych (metoda wywiadu).

Prowadząc takie badania, należy pamiętać, że dane z pojedynczej ankiety mają wartość statystyczną jedynie wtedy, jeśli zostały zebrane dla wielu osób (liczba ankietowanych jest zależna od zakresu badanych zagadnień). W przypadku, gdy interesuje nas typowe spożycie energii lub składników pokarmowych pacjenta, z tą samą osobą wywiad żywieniowy należy przeprowadzać wielokrotnie, zmniejszając przez to błędy

wynikające z „niestandardowego” sposobu żywienia w dniu przeprowadzania ankiety. Badając zwyczajową (typową) dietę, przyjmuje się, że minimalna liczba dni wymagana do oceny spożycia energii i składników odżywczych wynosi od 3 do 10. W przypadku niektórych składników, takich jak cholesterol, witamina A i C, które cechuje bardzo duża dobową zmienność, liczba dni niezbędnych do oceny wielkości typowego dla danej osoby spożycia powyższych składników wzrasta do około 20–50. Dodatkowe informacje o zmianach w sposobie odżywiania uzyskuje się, przeprowadzając ankietę zarówno w ciągu tygodnia, jak i w dni świąteczne. Dużym problemem podczas przeprowadzania badań żywieniowych jest kwestia niedoszacowania spożycia energii. Taka sytuacja może w konsekwencji prowadzić do niedoszacowania spożycia składników pokarmowych, co potwierdzają analizy z użyciem podwójnie znakowanej wody. Szczególną tendencję do niedoszacowania wielkości spożycia energii mają osoby otyłe, palacze tytoniu oraz osoby starsze, powyżej 60 roku życia, a także kobiety. Spowodowane jest to często zapominaniem lub celowym pomijaniem produktów z powodu niewygody albo chęci uproszczenia notowania, jak również celowym pomijaniem produktów uznanych za niezdrowe. Ograniczeniu wpływu tego rodzaju problemów związanych z raportowaniem może sprzyjać pouczenie uczestników badania o powyższych zjawiskach, zachęcenie ich do unikania jakichkolwiek zmian w typowym dla nich sposobie żywienia w trakcie prowadzenia badania, a także używanie albumu z przykładowymi rozmiarami porcji w celu ułatwienia pacjentowi oceny wielkości spożycia danego produktu lub potrawy. W przypadku, gdy pacjent samodzielnie wypełnia ankietę żywieniową, dobrą praktyką jest także zachęcanie go do wpisywania informacji do kwestionariusza na bieżąco.

Aby ocenić ilość składników odżywczych i nieodżywczych w posiłku, niezbędna jest znajomość ich zawartości w każdym ze zjadanych produktów składających się na ten posiłek. Dla wielu produktów spożywczych (np. masło, mąka, mleko), oraz potraw (przyrządzonych według określonych receptur, np. zupa pomidorowa, befsztyk) zostały one oznaczone w badaniach przeprowadzonych przez Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie (IŻŻ). W tych badaniach analitycznych oszacowano także wartość kaloryczną produktów i potraw. Oznaczone wartości pozwoliły na skonstruowanie bazy danych, na której podstawie program komputerowy przelicza wprowadzone dane z ankiety żywieniowej. Umożliwia to sprawne przeprowadzenie indywidualnej oceny sposobu odżywiania. Program porównuje uzyskane wyniki z zalecanymi normami, umożliwiając określenie niedoborów składników odżywczych i nieodżywczych dla każdej ankietowanej osoby. Program oblicza również poziom spożywanej w posiłkach energii.

Przewlekłe niedobory lub nadmiar składników odżywczych w diecie w stosunku do zapotrzebowania organizmu, a także niewłaściwy stosunek tych składników, może zaburzyć prawidłowy kierunek szlaków metabolicznych w organizmie, a tym samym mieć negatywny wpływ na zdrowie człowieka.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Przygotowanie do prowadzenia badań nad sposobem żywienia. Przeszkolenie w prawidłowym szacowaniu wielkości porcji spożywanych produktów żywnościowych. Ocena własnego sposobu odżywiania się.

Do wykonania tego ćwiczenia pomocny jest posiadanie programu do analizy diety, np. DietExpert, Dieta 4.0. lub dostęp do elektronicznej wersji publikacji: *Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych i potraw*¹ a także innych żywieniowych baz danych opublikowanych w Internecie.

Zadanie 1: Zapoznaj się z *Albumem fotografii produktów i potraw*² (IŻŻ). Zdjęcia pomagają oszacować gramaturę produktów żywnościowych i gotowych potraw według wizualnej wielkości porcji. Dokładnie obejrzyj wielkości porcji potraw, które najczęściej jadasz, i zapisz ich przybliżoną wagę. Np. ile waży cienka kromka ciemnego chleba z foremki, a ile gruba kromka chleba pszennego?

Zadanie 2: Przynieś ze sobą produkty, których gramaturę chcesz poznać, a które najczęściej spożywasz, np. kromka chleba, jabłko, jajko. Zważ je i porównaj z wielkościami porcji produktów przyniesionych przez innych studentów oraz skonfrontuj wyniki własnych pomiarów z informacjami podanymi w *Albumie fotografii produktów i potraw*. Zmierz wykalibrowaną miarką objętość używanych naczyń kuchennych, kubków, szklanek, filiżanek, głębokich talerzy. Zmierz i zważ objętość łyżek i łyżeczek oraz porównaj, jaka jest różnica wagi między łyżeczką płaską a kopiatą.

¹ H. Kunachowicz, et al, *Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych i potraw*, Warszawa 2005. Dostęp do publikacji w wersji elektronicznej po darmowym zalogowaniu się na stronie IŻŻ: www.izz.waw.pl.

² L. Szponar, K. Wolnicka, E. Rychlik, *Album fotografii produktów i potraw*, Warszawa 2000 (album dostępny również na płycie CD).

Zadanie 3: Przygotuj materiał na kolejne zajęcia, zapisując przez cały tydzień **wszystkie** potrawy i produkty, które zjadasz, oraz ich ilość. Jadłospis prowadź dokładnie, nie pomijając niczego. Absolutna uczciwość zapisu zwiększa dokładność oceny sposobu żywienia. Zapisz również pory posiłków. Wielkość zjadanych porcji oceń za pomocą *Albumu fotografii produktów i potraw* (co będzie szczególnie przydatne, jeżeli jadasz poza domem) oraz własnych obserwacji uzyskanych podczas wykonywania zadania 2. Zapisuj gramaturę produktów podaną przez producenta na opakowaniu (np. pół opakowania sera o wadze 120 g). Ilość wypijanych płynów oceń za pomocą objętości naczyń, korzystając z wiedzy wyniesionej z zadania 2.

Można również sporządzić szczegółowy jadłospis z trzech dni: dwóch dni roboczych i jednego dnia weekendowego.

Zebrany jadłospis posłuży Ci w ocenie sposobu odżywiania przy użyciu żywieniowej bazy danych. Im dokładniej poprowadzisz jadłospis, tym dokładniejszy i bardziej wiarygodny będzie obraz Twojego żywienia.

Zadanie 4: Wprowadź do programu dietetycznego wszystkie potrawy i produkty żywieniowe, które zjadłeś w badanym okresie. Jeżeli nie dysponujesz programem do oceny żywienia, skorzystaj z publikacji: *Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych i potraw* lub baz internetowych, np.:

- www.izz.waw.pl/ (dostęp do bazy wymaga wcześniejszego zalogowania się),
- www.wolframalpha.com/examples/FoodAndNutrition.html,
- www.dobradieta.pl/tabele.php,
- ndb.nal.usda.gov.

Uzyskane w ten sposób dane zanalizuj według poniższych wskazówek:

Porównaj dzienną **wartość energetyczną** pożywienia w poszczególnych dniach z zapotrzebowaniem energetycznym obliczonym dla siebie podczas zajęć na temat całkowitej przemiany materii. Zanalizuj, jak teoretycznie wyglądałyby zmiany w masie ciała, gdyby wartość energetyczna codziennych posiłków zmieniła się przez następne 10 lat o 100 kcal dziennie.

Porównaj wartość energetyczną **śniadań, obiadów, kolacji i pozostałych posiłków** w kolejnych dniach, w których zbierano dane. Zwróć uwagę na różnice między dniami powszednimi a weekendem. W jakim procencie pokrywane jest dzienne zapotrzebowanie energetyczne przez śniadania, obiady, kolacje i pozostałe posiłki. Wyniki przedstaw w formie wykresu kołowego.

Oceń i skomentuj, co jest głównym źródłem energii w twoich posiłkach.

Oblicz procentowy udział **węglowodanów, białek i tłuszczu** w całkowitej zawartości energetycznej dziennych posiłków. Ich prawidłowe proporcje powinny wynosić: 12–15% racji energetycznej z białek, 30–35% z tłuszczu i 50–55% z węglowodanów. Jeśli twoje wyniki odbiegają od nich, to co należy zmienić (jakie składniki pokarmowe i w jakich ilościach) w twoich posiłkach?

Zanalizuj, jakie są proporcje spożycia kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych oraz białka roślinnego i zwierzęcego w każdym dniu. Ile powinny wynosić ich prawidłowe proporcje? Jeśli tak nie jest, to co należy zmienić w twoich posiłkach?

Zanalizuj poziom spożycia błonnika oraz cholesterolu i porównaj z zalecanymi normami.

Porównaj zawartość witamin przeciwutleniających (**C, A, E**) w pokarmie w każdym dniu. Porównaj z zalecanym dziennym poziomem spożycia.

Porównaj z zalecanymi normami średnie spożycie witamin: **B₁, B₂, B₆, PP, kwasu foliowego** i składników mineralnych: **wapnia, fosforu, żelaza, cynku i magnezu**. Porównaj średni codzienny sposób odżywiania ze sposobem odżywiania w dniach świątecznych.

Na podstawie obliczonego spożycia witamin i składników mineralnych z dziennych racji pokarmowych (witamin: **C, A, E, B₁, B₂, B₆, PP, kwas foliowy** oraz składników mineralnych: **wapnia, fosforu, żelaza, cynku i magnezu**) określ, jakie produkty spożywcze i w jakich ilościach powinny być spożywane (realnie), aby zaspokoić dzienne zalecane zapotrzebowanie.

Jeśli zaobserwowano niedobory składników odżywczych, należy zanalizować, co jest ich przyczyną i omówić, jak można im zapobiec.

Zadanie 5: Korzystając z żywieniowej bazy danych i/lub publikacji *Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych i potraw* lub programu dietetycznego porównaj:

- jaka jest różnica między urozmaiconą zdrową dietą (ZD), a dietą opartą na produktach z barów typu fast food (FF)?
- jaka jest różnica w kaloryczności obu diet?
- jaka jest różnica w realizacji dziennego zapotrzebowania na witaminy i związki odżywcze?

Zdrowa dieta:

ZD 1

I śniadanie: kromka razowego chleba, płaska łyżeczka masła, jajko na miękko, porcja sałatki z pomidora, sałaty i szczypiorku, zielona herbata bez cukru,

II śniadanie: kawałek arbuza, garść orzechów i nasion,

Obiad: szklanka zupy z rukoli i soczewicy, 100 g duszonego kurczaka bez skóry, porcja kaszy gryczanej z warzywami i olejem dyniowym, kiszony ogórek, łyżka zielonego groszku, niesłodzony napar z mięty,

Podwieczorek: kiwi, szklanka soku owocowego bez cukru,

Kolacja: kromka chrupkiego pieczywa, plaster chudego białego sera lub tofu, 3 łyżki sałatki z warzyw sezonowych, kawa zbożowa na szklance chudego mleka lub mleka migdałowego.

ZD 2

I śniadanie: 4 łyżki musli z orzechami, szklanka kefiru lub jogurtu, pół grejpfruta lub kilka truskawek,

II śniadanie: 2 kromki chrupkiego chleba, pasta z fasoli i suszonych pomidorów, kilka rzodkiewek, jabłko, herbata ziołowa,

Obiad: szklanka zupy dyniowej, porcja pieczonej ryby, 3–4 łyżki kaszy jaglanej z soczewicą, porcja surówki z kapusty, marchwi i jabłka z łyżeczką oleju lnianego,

Podwieczorek: koktajl ze szpinaku i połowy banana, kisiel z truskawkami, lub budyń na chudym mleku,

Kolacja: pasztet z ciecierzycy, kromka razowego pieczywa, szklanka soku pomidorowego, woda mineralna niegazowana.

Dieta z barów fast food:

FF 1

I śniadanie: tost z boczkiem i serem, duża kawa z 3 łyżeczkami cukru,

II śniadanie: cheeseburger, sałatka z sosem majonezowym, 0,3 l napoju gazowanego typu cola,

Obiad: porcja panierowanego kurczaka, duża porcja frytek, 0,5 l napoju gazowanego, lody z polewą karmelową,

Podwieczorek: ciastko z jabłkiem, koktajl truskawkowy,

Kolacja: tortilla, średnia porcja frytek, herbata z 2 łyżeczkami cukru.

Zadanie 6: Zanalizuj wartość odżywczą i energetyczną, jednej z modnych i lansowanych przez Internet lub czasopisma diet. Zanalizuj jej wartość energetyczną i odżywczą (zawartość białka, tłuszczów, węglowodanów, błonnika, witamin: **C, A, E, B₂, B₆, kwasu foliowego oraz wapnia, żelaza, cynku i magnezu**), a następnie porównaj te wyniki z normami.

6. Piramida żywieniowa

WSTĘP

Zbilansowana dieta jest kluczem do zachowania zdrowia i dobrego samopoczucia. Najważniejsze postępowanie dietetyczne obejmuje następujące zalecenia:

1. Posiłki powinny być urozmaicone.
2. Zawsze przynajmniej połowę składników potrawy powinny stanowić warzywa i owoce.
3. Należy przede wszystkim wybierać produkty sezonowe i lokalne.
4. Należy kupować jak najmniej przetworzoną żywność.
5. Mięso należy zjadać z umiarem, nie więcej niż 500 g na tydzień. Zastępować je można rybami, roślinami strączkowymi, jajkami.
6. Należy ograniczać spożycie tłuszczów nasyconych (smalec, masło, margaryny). Zamiast nich należy włączyć do posiłków oleje roślinne tłoczone na zimno, z pierwszego tłoczenia, spożywane na surowo.
7. Należy unikać cukru i słodczy, a także słodzonych napojów i słodzików.
8. Należy używać jak najmniej soli, nie więcej niż jedną łyżeczkę dziennie (wliczając w to sól w produktach przetworzonych!). Do przygotowania używać dużej ilości ziół.
9. Pełnoziarniste produkty zbożowe, szczególnie kasze, powinny być głównym źródłem energii, w ilości zależnej od zapotrzebowania.
10. Najlepszymi przekąskami są nasiona i orzechy oraz warzywa. Można sięgać po nie między posiłkami.
11. Należy wypijać dziennie przynajmniej 1,5 l płynów, najlepiej wody mineralnej, naparów, świeżych soków. Unikać należy alkoholu i napojów słodzonych

12. Należy dbać o utrzymanie zalecanej masy ciała.
13. Nigdy nie wolno wychodzić z domu bez śniadania.

W komponowaniu diety pomocna jest tzw. piramida dietetyczna. Jest to graficzne zestawienie zalecanych grup produktów spożywczych w codziennej zrównoważonej diecie, w którym podstawą piramidy są produkty o zalecanym największym poziomie spożycia. Następne poziomy piramidy przedstawiają produkty o zmniejszającej się ilości porcji. Szczyt piramidy zajmują produkty, których należy unikać, a ich spożywanie może być wyłącznie sporadyczne.

Pierwsze opracowania piramidy zwracały uwagę na szkodliwość nadmiaru tłuszczu w diecie oraz na podstawę wyżywienia wskazywały produkty zawierające skrobię.

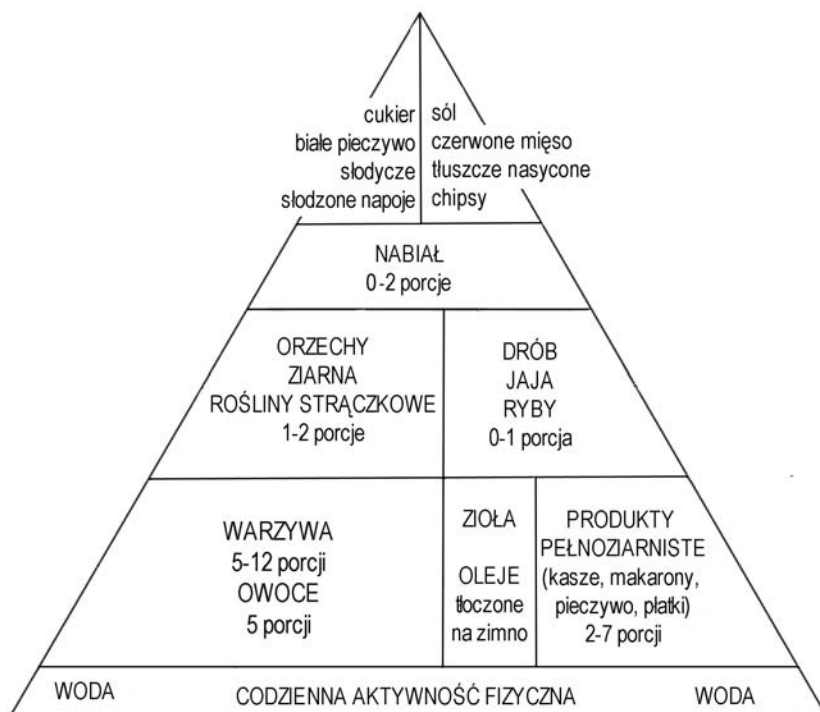
Obecnie zalecenia zostały uszczegółowione na Uniwersytecie Harvarda głównie o rodzaj rekomendowanych do spożycia węglowodanów i tłuszczu (Rycina 9).

Codzienna dieta powinna bazować przede wszystkim na warzywach i owocach. Te produkty powinny wchodzić w skład wszystkich posiłków (6–10 porcji dziennie), przy czym owoce bogate w cukry proste powinny być mniej liczne, a dominującą rolę odrywać powinny różnorodne warzywa. Bazować należy przede wszystkim na produktach sezonowych i lokalnych, jako najbogatszych w składniki odżywcze.

Energię dostarczają głównie pełnoziarniste produkty zbożowe w ilości zależnej od zapotrzebowania energetycznego. Im aktywniejszy tryb życia, tym więcej porcji produktów pełnoziarnistych należy włączać do posiłków. Najlepszym wyborem są kasze, a szczególnie ziarna bezglutenowe. W przypadku pieczywa powinno być pieczone z mąki z pełnego przemiału i spulchniane naturalnym zakwasem, ponieważ dzięki fermentacji bakteryjnej rozkładane są kwasy fitynowe utrudniające wchłanianie mikropierwiastków w jelitach. Do posiłków można dodawać niewielkie ilości tłuszczów roślinnych tłoczonych na zimno (ok. łyżeczki), jako źródła wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Codziennie powinniśmy spożywać 1–2 porcji różnego rodzaju orzechów, ziaren, roślin strączkowych i produktów z nich przygotowanych (np. pasty do smarowania pieczywa), a także porcję białka zwierzęcego w postaci ryby, chudego mięsa lub jajek. Białko zwierzęce nie jest konieczne w diecie codziennej, jednak osoby rezygnujące ze spożywania mięsa z przyczyn etycznych nie powinny zrzekać się spożycia jajek, jako źródła doskonałego gatunkowo białka zwierzęcego, witaminy B₁₂ i składników mineralnych. Tygodniowe spożycie mięsa nie powinno przekroczyć 500 g.

Rycina 9. Zmodyfikowana piramida żywieniowa



Źródło: opracowanie M. Kalemby-Drożdż.

Osobne piętro piramidy zajmuje nabiał. W pierwszej kolejności należy wybierać nabiał fermentowany (żółte sery, kefir, jogurt) i nigdy całkowicie odtłuszczony. Produkty mleczne są cennym źródłem białka i wapnia, jednakże ze względu na liczne przypadki nietolerancji tych produktów na skutek alergii na białka mleka lub niezdolności trawienia laktozy, mogą istnieć przesłanki do całkowitej jego eliminacji. Może się to odbyć bez utraty wartości odżywczej diety pod warunkiem prawidłowego doboru składników występujących na niższych piętrach piramidy. Nabiał powinien być spożywany w osobnym posiłku i nie łączony z produktami z innych pięter, ze względu na silne ograniczenie wchłaniania składników mineralnych przez białka mleka.

Produkty, których spożycie należy ograniczać, to produkty zawierające węglowodany o wysokim IG, czyli białe pieczywo i produkty z białej mąki, słodycze, biały ryż, wysokoskrobiowe ziemniaki, słodzone napoje (również słodzone słodzikami ze względu na ich udokumentowane działanie insulinogenne). Należy także ograniczać spożycie nasyconych

tłuszczów (masło, smalec, margaryny), czerwonego mięsa i dużych ilości soli, a także chipsów. Są to produkty podnoszące ryzyko chorób dietozależnych przede wszystkim: otyłości, cukrzycy, miażdżycy i chorób układu krążenia.

W piramidzie Harwardzkiej rekomendowane jest również czerwone wino, ze względu na zawarte w nim flawonoidy o działaniu prozdrowotnym (więcej informacji o flawonoidach znajduje się w rozdziale 12), w ilości nie większej niż kieliszek dziennie, jednak ogólnie nie zaleca się wprowadzania jakiegokolwiek alkoholu do diety. Naszym wkładem do piramidy dietetycznej są zioła ze względu na ich udokumentowane ochronne działanie przeciwko procesom nowotworowym i silne właściwości przeciwutleniające. Ponadto posiłki powinny zawierać zrównoważoną ilość produktów pod względem ich kwasotwórczości i zasadowotwórczości. Do zasadowotwórczych zalicza się: warzywa, owoce i produkty mleczne, natomiast produktami kwasotwórczymi są głównie zboża, mięso, ryby i jaja. Równowagę osiąga się, jedząc duże ilości warzyw, a niewielkie ilości produktów kwasotwórczych.

Należy również pamiętać o przyjmowaniu odpowiedniej ilości płynów. Najlepszym wyborem jest woda – mineralna lub przegotowana. Wskazane są również herbaty zielone i czarne, napary ziołowe, herbatki owocowe, bezcukrowe kompoty. Należy pić około 1,5–2 l płynów dziennie, pamiętając o niepopijaniu posiłków ze względu na zmniejszenie wydolności trawienia na skutek nadmiernego rozcieńczenia soków trawiennych oraz możliwe ograniczenie wchłaniania niektórych pierwiastków pod wpływem flawonoidów z naparów herbacianych.

Dotychczasowe podejście do układania jadłospisów i kładzenie naciśku przede wszystkim na ilość dostarczanej energii oraz proporcje między składnikami energetycznymi wydają się niewystarczające. Podaż odpowiedniej ilości białek, węglowodanów i tłuszczów nie gwarantuje zdrowej diety, bogatej w składniki mineralne, witaminy i flawonoidy. Pełna analiza dietetyczna, dzięki której można zbadać szczegółowo realizację zapotrzebowania na niemal wszystkie składniki odżywcze, jest przydatnym narzędziem dla dietetyków i lekarzy, jednak dla przeciętnego człowieka jest niepraktyczna. Zwykłemu człowiekowi często brakuje wiedzy dietetycznej oraz umiejętności doboru odpowiednich produktów spożywczych. Ponadto kierowanie się tabelami kalorycznymi przez laików może prowadzić do nieodpowiednich nawyków żywieniowych i doboru produktów spożywczych ze względu na ich energetyczność, a nie zawartość składników odżywczych, co może spowodować eliminację z diety orzechów lub olejów roślinnych jako zbyt kalorycznych. Profesjonaliści też nie są wolni od wynaturzeń w kwestii układania jadłospisów. Zwracając uwagę jedynie na zawartość białka, węglowoda-

nów i tłuszczu w produktach, przez wiele lat nie przykładano wagi do rodzaju spożywanych tłuszczów czy węglowodanów i jeszcze do niedawna obowiązujący model żywienia zakładał eliminację wszystkich tłuszczów (a nie jak obecnie – nasyconych) oraz stanowienie ziemniaków lub białego pieczywa podstawą każdego posiłku. Nagminna wśród lekarzy była (i nadal jest) praktyka przepisywania suplementów z witaminami i mikroelementami zamiast polecania pacjentom urozmaiconej diety bogatej w nieprzetworzone produkty roślinne. Aktualne trendy w dietetyce zwracają uwagę przede wszystkim na gęstość odżywczą, a nie wartość kaloryczną pokarmów. Jest to cenna wskazówka, jednak nie należy zapominać o zróżnicowanych możliwościach wchłaniania mikroelementów z pokarmów roślinnych i zwierzęcych oraz z produktów o różnym stopniu przetworzenia. Np. żelazo pochodzenia zwierzęcego wchłania się 10-krotnie łatwiej niż żelazo z produktów roślinnych, chyba że to ostatnie będzie spożywane w obecności witaminy C lub kwasów organicznych (np.: jabłkowego, cytrynowego). Kwas szczawowy obecny w produktach roślinnych (np.: botwina, rabarbar, kakao, produkty sojowe) utrudnia wchłanianie mikroelementów, podobnie jak kazeina i wapń zawarte w nabiale. Natomiast obróbka termiczna zwiększa przyswajalność białka i pierwiastków, jednak zmniejsza zawartość niektórych witamin.

W układaniu jadłospisu i pojedynczych posiłków należy zatem stawiać przede wszystkim na różnorodność menu, w wyborach kierując się rodzajem produktu i jego jakością, a nie ilością kalorii, które dostarcza, stosując proporcje między produktami zalecanymi w piramidzie żywienia.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

Przykładowe porcje produktów spożywczych do wykorzystania w konstruowaniu jadłospisów:

Jedna porcja to zazwyczaj około 100 g lub tyle, ile się mieści w pełnej garści.

- Produkty skrobiowe pełnoziarniste: mała bułka pełnoziarnista lub $\frac{1}{2}$ dużej, kromka chleba, 4 kromki pieczywa chrupkiego, $\frac{1}{2}$ szklanki gotowanej kaszy, płatków zbożowych lub ryżu, szklanka makaronu (ugotowanego *al dente*), $\frac{1}{3}$ szklanki musli, 2 małe ziemniaki sezonowe.
- Warzywa: średni ogórek, papryka lub pomidor, szklanka surówki z warzyw, 2–3 łyżki gotowanych warzyw (szpinak, brokuły, kapusta, buraczki, fasolka itp.), 5–6 liści sałaty, $\frac{3}{4}$ szklanki soku z warzyw.

- Owoce: średnie jabłko, gruszka, banan, $\frac{3}{4}$ dużej pomarańczy, $\frac{3}{4}$ szklanki drobnych owoców: malin, truskawek, wiśni, borówek, winogron, $\frac{1}{2}$ grejpfruta, $\frac{2}{3}$ szklanki soku z owoców.
- Mleko i produkty mleczne: szklanka mleka, kubeczek kefiru lub jogurtu, średni plaster twarogu, mały serek topiony, 2 plastry sera żółtego.
- Produkty białkowe: około 100 g chudego mięsa, $\frac{1}{2}$ piersi kurczaka lub udko, 5–6 cienkich plasterów wędliny, ryba około 100 g, $\frac{2}{3}$ szklanki ugotowanych nasion strączkowych (fasola, groch, soja), 2 jajka, $\frac{1}{2}$ szklanki orzechów lub ziaren (ok. 50 g)
- Tłuszcze: łyżeczka oleju, łyżeczka masła, łyżka majonezu
- Słodycze: małe ciastko, 4–6 cukierków, $\frac{1}{4}$ czekolady, 3 czekoladki, gałka lodów, 30 g chipsów, łyżka miodu lub dżemu, pół szklanki słodzonego napoju, 2 łyżeczki cukru
- Alkohol: 1 porcja to 20 g czystego etanolu

Rycina 10. Zasada połowy talerza



Źródło: opracowanie M. Kalembe-Drożdż

W przypadku komponowania poszczególnych posiłków pomocna jest zasada połowy talerza. Podziel talerz na pół, jedną z połówek znowu podziel na połowę. Na jednej ćwiartce powinny znajdować się produkty białkowe do wyboru, np. ryba (najlepiej tłusta, ponieważ ryby zawierają cenne kwasy tłuszczowe omega-3), chude mięso, jajka albo rośliny strączkowe. Na drugiej ćwiartce powinny znajdować się złożone węglowodany, np. kasze, pełnoziarnisty chleb, brązowy ryż, płatki zbo-

zowe nieprażone, musli. Przynajmniej połowę talerza zawsze powinny zajmować warzywa i owoce. Jeżeli ktoś stosuje dietę niełączenia, lub ma mniejsze zapotrzebowanie na dane składniki, ćwiartkę węglowodanową lub białkową należy zastąpić warzywami. Można również komponować posiłki wyłącznie warzywno-owocowe. Do posiłku dodaj nienasycone tłuszcze dziewicze: łyżkę oliwy *extra vergine* lub oleju z dyni, słonecznika, pestek winogron, lnianego (tłoczonego na zimno) albo posyp potrawę nieprażonymi ziarnami lub orzechami. Pamiętaj o przyprawianiu potraw ziołami.

CEL:

Zapoznanie się z obowiązującymi zaleceniami dietetycznymi zgodnie z aktualną wiedzą na ten temat. Konstruowanie zbilansowanych jadłospisów.

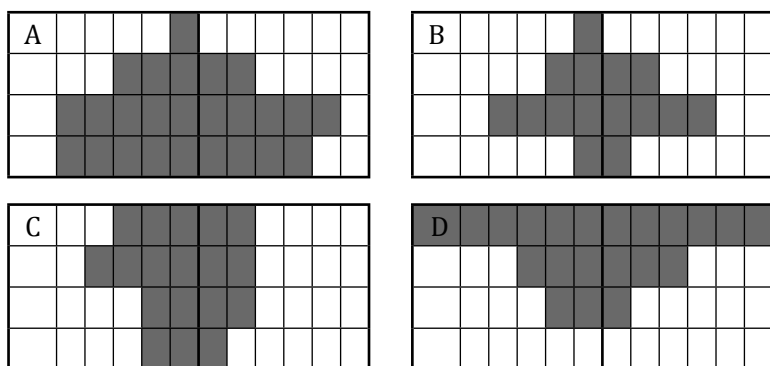
Zadanie 1: Spisz wszystkie produkty spożywane przez Ciebie w ciągu trzech dni, dwóch dni roboczych i jednego weekendowego, łącznie z informacjami na temat ilości zjadanych pokarmów. Określ ilość pokarmów według ilości porcji produktów żywnościowych opisanych we wstępie. Zwróć uwagę, że jedno danie może składać się z kilku grup produktów, np. talerz zupy pomidorowej z ryżem to porcja węglowodanów i porcja warzyw.

Narysuj piramidę żywieniową dla każdego analizowanego dnia, używając ilości porcji zjadanych grup produktów żywnościowych i korzystając ze schematu (Rycina 11). Każda zakreślona kratka oznacza jedną porcję z danej grupy produktów. Zakreślanie należy zaczynać od środkowej linii zgodnie z podaną numeracją. Sprawdź, w jakim stopniu twoja piramida odbiega od zalecanych proporcji produktów spożywczych w diecie? Prawidłowy sposób żywienia obrazuje „piramida”, „domek” lub, przy niskim zapotrzebowaniu energetycznym, kształt „listka” (Rycina 12) (*Przykłady prawidłowo (A i B) i nieprawidłowo (C i D) skomponowanej diety*). Czy w twojej diecie znajduje się ponad 5 porcji warzyw i owoców? Ile porcji mięsa dziennie zjadasz? Jakie są proporcje między białkami zwierzęcymi a roślinnymi? Jakie produkty podjadasz między posiłkami?

Rycina 11. Schemat do rozrysowania własnej piramidy żywieniowej. Metodę można uszczegółowić, zakreślając warzywa w kratkach parzystych a owoce w nieparzystych, podobnie z białkami: roślinne w parzystych, a zwierzęce w nieparzystych

11	9	7	5	3	1	2	4	6	8	10	12	cukry proste, biała mąka, tłuszcze nasycone, czerwone mięso, alkohol
11	9	7	5	3	1	2	4	6	8	10	12	białe mięso, jaja, ryby, nabiał, strączkowe, nasiona, orzechy
11	9	7	5	3	1	2	4	6	8	10	12	warzywa i owoce
11	9	7	5	3	1	2	4	6	8	10	12	produkty pełnoziarniste

Rycina 12. Przykłady prawidłowo (A i B) i nieprawidłowo (C i D) skomponowanej diety



Źródło: opracowanie M. Kalemba-Drożdż

Zadanie 2: Ułóż pełnowartościowy tygodniowy jadłospis wegetariański. Zanalizuj go pod kątem pokrycia zapotrzebowania na wszystkie składniki odżywcze i nieodżywcze oraz określ główne źródła tych składników w proponowanych produktach. Jeżeli ułożony jadłospis nie zapewnia zgodnych z zalecanymi normami ilości składników odżywczych, zaproponuj, jak go zmodyfikować.

Czy wiesz, czym charakteryzują się diety: jarostwo, laktoowoewegitarianizm, laktoewegitarianizm, owowegetarianizm, weganizm, witarianizm, frutarianizm, dieta RAW, dieta paleo?

Zadanie 3: Zazwyczaj potrafimy określić kilka najbardziej oczywistych tradycyjnie wymienianych produktów, które zawierają duże ilości

określonych składników odżywczych. Jednak nie znamy alternatywnych źródeł tych składników. W żywieniowej bazie danych znajdź 10 produktów o wysokiej zawartości:

- białka, ale nie pochodzenia zwierzęcego,
- wapnia, ale nie z nabiału i innych produktów zawierających dodatki nabiału,
- magnezu, ale nie czekolada i kakao,
- żelaza, ale nie pochodzenia zwierzęcego,
- witaminy E, ale nie z olejów roślinnych i margaryn.

Powinny to być produkty niefortyfikowane i gotowe do spożycia (np. suchych nasion roślin strączkowych nie można bezpośrednio zjeść). Porównaj zawartość składników odżywczych w odnalezionych produktach do tradycyjnie wymienianych źródeł.

Zadanie 4: Dieta przeciętnego Polaka jest bardzo mało urozmaicona. Często na przeszkodzie włączaniu do jadłospisu nowych produktów stoi brak znajomości odpowiednich receptur ich przyrządzania. Korzystając z przeglądarek przepisów kulinarnych (np. zmiksowani.pl, durszlak.pl), znajdź ciekawe i apetyczne przepisy na przekąskę, zupę, danie główne oraz deser/ciasto/napój zawierające następujące produkty: rukola, szpinak, pokrzywa, kasza jaglana, kasza gryczana, cukinia, bakłażan, dynia, fasola, ciecierzycza (czyli należy znaleźć po cztery przepisy z każdym produktem).

Zadanie 5: Dieta wielu osób nie spełnia wszystkich zalecanych norm żywieniowych ze względu na niski status materialny oraz niewystarczającą świadomość zdrowotną. Przygotuj tygodniowy jadłospis dla jednej osoby, możliwie spełniający w jak największym stopniu zalecane normy dietetyczne, zakładając, że koszt tygodniowych posiłków nie może przekroczyć wartości minimum egzystencjalnego przeznaczanego przez jedną osobę na żywność w przeliczeniu na tydzień. Dane na temat aktualnych wartości minimów znajdują się na stronie Instytutu Pracy i Spraw Socjalnych: www.ipiss.com.pl. Np. w roku 2009 wartość minimum egzystencjalnego przeznaczonego na żywność dla jednej osoby na tydzień wynosiła 45 zł (180 zł na osobę na miesiąc), w roku 2010 – 48,5 zł (194 zł na osobę na miesiąc), w latach 2011 i 2012 – 51 zł na osobę na tydzień (206 zł na osobę na miesiąc)

Zadanie 6: W celu osiągnięcia zdrowia warto skupić się na jasno określonych celach, w zakresie których można osiągnąć miarodajny sukces. W kwestii właściwego odżywiania najważniejsze są: spożywanie dużej ilości warzyw i owoców (przynajmniej pięć porcji dziennie),

ograniczanie spożycia tłuszczów nasyconych i węglowodanów prostych, codzienne jedzenie śniadania. W zakresie aktywności fizycznej należy: chodzić pieszo przez przynajmniej godzinę dziennie, przynajmniej dwa razy w tygodniu ćwiczyć intensywnie przez 15–30 min, oraz nigdy nie siedzieć bez ruchu dłużej niż dwie godziny bez przerwy. W kwestii ograniczania stresu ważne jest okazywanie życzliwości ludziom, asertywność oraz realizowanie zaplanowanych zadań. W zakresie higieny osobistej należy przede wszystkim wyeliminować wszelkie uzależnienia oraz zadbać o profilaktykę.

Zastanów się dogłębnie nad swoim trybem życia i przygotuj plan poprawy swojego zdrowia zgodnie z poniższą tabelą.

Tabela 15. Osobisty plan poprawy zdrowia

Problem	Jakie błędy popełniam?	Co mogę poprawić natychmiast?	Co chciałbym zrobić później? Kiedy to nastąpi?
Właściwe odżywianie się			
Systematyczna aktywność fizyczna			
Ograniczanie skutków stresu			
Higiena osobista			

Źródło: opracowano na podstawie: *Podstawy teoretyczne programu: „Trzymaj formę”*. Główny Inspektorat Sanitarny, Warszawa 2007.

Przemyśl powody, które rzeczywiście stoją Ci na przeszkodzie we wprowadzeniu zdrowych nawyków?

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Willet W., Skerrett P., *Eat, Drink and Be Healthy*, New York–London–Toronto–Sydney 2005.

Fuhrman J., *Eat to Live: The Amazing Nutrient-Rich Program for Fast and Sustained Weight Loss*, New York 2011.

Dunn R., *The Wild Life of Our Bodies*, New York 2011.

Taubes G., *Dlaczego tyjemy i jak sobie z tym poradzić?*, Kraków 2012.

Taubes G., *Good Calories, Bad Calories*, New York 2007.

Wrangham R., *Walka o ogień. Jak gotowanie stworzyło człowieka*, tłum. A.E. Eichler, M. Kawalec, Warszawa 2009.

7. Nadwaga i normalizacja masy ciała

WSTĘP

Otyłość to ogromny społeczny problem. Każdego roku liczba ludzi otyłych i osób z nadwagą zwiększa się mimo nieustannie prowadzonej akcji edukacyjnej o konieczności racjonalnego odżywiania i wysokiej aktywności fizycznej. Otyłość przyczynia się do wielu chorób, które nie tylko zagrażają życiu, ale skazują wielu ludzi na cierpienie i ograniczoną sprawność fizyczną. Do najczęściej występujących chorób, które nierozwalnie wiążą się z otyłością należą:

- schorzenia układu sercowo-naczyniowego (niewydolność serca, nadciśnienie tętnicze, udary mózgu, inne choroby naczyń krwionośnych),
- choroby układu oddechowego,
- cukrzyca,
- nowotwory,
- zwyrodnienia układu kostno-stawowego.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Zaplanowanie diety, która przywróciłaby pacjentowi z nadwagą prawidłową masę ciała. Oznacza to, że powinien on otrzymać długoterminowy plan diety na każdy dzień tygodnia (wszystkie posiłki). Zaplanowana dieta powinna zapewnić mu spadek masy ciała z szybkością nie większą niż 1 kg tygodniowo oraz zapewnić podaż wszystkich składników odżywczych i nieodżywczych w ilości zgodnej z zalecanymi norma-

mi. Pamiętaj także o zaplanowaniu aktywności fizycznej na każdy dzień, uwzględniającej upodobania i wydolność fizyczną pacjenta.

Zadanie 1:

Wyobraź sobie, że przychodzi do Ciebie kobieta z wyraźną nadwagą. Badania lekarskie nie stwierdziły u niej żadnych uzasadnionych chorobowo przyczyn nadwagi.

Z wywiadu i pomiarów antropometrycznych wynika, że kobieta ma 23 lata, 170 cm wzrostu, waży 84 kg, jest drobnokoścista, prowadzi bardzo mało aktywny tryb życia.

1. Oblicz współczynnik masy ciała pacjentki (BMI), jej całkowitą i podstawową przemianę materii, a następnie ustal jej prawidłową (jednocześnie docelową) masę ciała, by jej BMI mieścił się w zalecanych normach. Skorzystaj z tabel i nomogramów w rozdziale 1 (s. 11–19).
2. Oblicz, jakiej ilości tkanki tłuszczowej pacjentka musi się pozbyć, aby osiągnąć prawidłową masę ciała (pamiętaj, że 1g tłuszczu to 9 kcal, a zawartość tłuszczu w tkance tłuszczowej wynosi ok. 80%).
3. Wiedząc, jaką ilość energii zawartej w tkance tłuszczowej pacjentka powinna spalić, oblicz, do ilu kalorii można ograniczyć dzienne zapotrzebowanie energetyczne pacjentki, żeby zachowała dobre samopoczucie, a równocześnie systematycznie chudła. Pamiętaj, że ograniczenie nie powinno być większe niż 30% wyliczonego aktualnego zapotrzebowania energetycznego i że równocześnie całkowita kaloryczność dziennej diety nie powinna spaść poniżej 1 500 kcal. Jadłospis musi być opracowany precyzyjnie, np. jeśli planujesz kromkę z masłem, musisz zaznaczyć, jakiej ma ona być grubości i ile na niej może znajdować się masła.
4. Planując styl życia pacjentki na okres odchudzania, musisz wskazać, jakiego typu aktywność fizyczną powinna uprawiać (uwzględnij jej preferencje i fizyczne możliwości) oraz jak powinna zmodyfikować swój dotychczasowy tryb życia. Uwzględnij w obliczeniach dane zawarte w tabelach opisujących wielkości wydatku energetycznego dla różnych aktywności fizycznych.
5. Przeanalizuj jadłospis, wprowadzając dane do żywieniowej bazy danych lub programu dietetycznego (rozdział 5, s. 59–64). Obliczając średnie spożycie składników odżywczych i nieodżywczych z całego tygodnia zaplanowanego jadłospisu, sprawdź, czy planowane spożycie wszystkich analizowanych składników jest zgodne z normami prawidłowego żywienia.
6. Jeśli analiza wykaże niedobory w składnikach odżywczych i nieodżywczych, wprowadź odpowiednią korektę do planów dietetycznych, uzupełniając niedobory.

8. Alergie i nietolerancje pokarmowe

WSTĘP

Nietolerancje i alergie pokarmowe stanowią coraz częstsze zjawisko pojawiające się zarówno wśród dzieci, jak i dorosłych. Objawy chorobowe alergii pokarmowej i nietolerancji często mogą być do siebie podobne, choć etiologia tych schorzeń jest zupełnie odmienna.

Alergia pokarmowa to niekorzystna gwałtowna reakcja immunologiczna organizmu na spożycie określonej żywności. Najczęściej występują alergie powstające za pośrednictwem IgE (nadwrażliwość typu I) oraz za pośrednictwem limfocytów T (nadwrażliwość typu IV). IgG natomiast mają znaczenie w rozwoju opóźnionych alergii pokarmowych (ang. *delayed food allergies*). Natomiast nietolerancja pokarmowa jest wrogą reakcją organizmu na składnik pokarmu, ale nieangażującą układu odpornościowego. Reakcja ta jest wyrazem zaburzeń metabolicznych w przyswajaniu lub metabolizowaniu określonego składnika. Jeden pokarm może powodować zarówno nietolerancję, jak i alergię. Przykładem jest pszenica, której białka mogą wywołać odpowiedź immunologiczną, a gluten w niej zawarty może być nietolerowany na skutek niedojrzałości układu pokarmowego. Wrodzona i nieuleczalna nietolerancja glutenu to celiakia (choroba trzewna). Podobnie jak mleko, na które może wystąpić nietolerancja pokarmowa cukru mlecznego (laktozy), na skutek braku enzymu rozcinającego laktozę – laktazy. Nietolerancja mleka może również wynikać z braku zdolności do trawienia kazeiny, czyli białka skrzepowego, którego w mleku krowim jest ponad 2,5 g/l (70% wszystkich białek), a dla porównania w mleku ludzkim kazeina występuje w dziesięciokrotnie mniejszym stężeniu (zaledwie 0,25 g/l i stanowi 35% wszystkich białek). Natomiast przyczyną reakcji alergicznej na mleko krowie jest odpornościowa odpowiedź organi-

zmu na obecność białek w nim zawartych. W mleku krowim znajduje się ponad 20 różnych rodzajów białek i każde z nich jest potencjalnym alergenem. Największe znaczenie dla alergików mają: β -laktoglobulina (najsilniejszy alergen), albumina surowicy bydlęcej (zazwyczaj nie wywołuje objawów po przegotowaniu mleka), α -laktoglobulina, kazeina.

Niekorzystna odpowiedź organizmu na dany składnik pokarmowy jest reakcją osobniczą i zależy od sprawności układu odpornościowego oraz rodzaju spożytego pokarmu. Dane epidemiologiczne szacują, iż w Polsce liczba dzieci z nietolerancjami pokarmowymi podwaja się co 10 lat, a obecnie prawdopodobnie cierpi na nie co najmniej co dziesiąte dziecko do trzeciego roku życia. Natomiast w przypadku nietolerancji pokarmowych niezależnych od IgE szacuje się, że dotkniętych nimi jest ponad 45% dorosłej populacji europejskiej.

Alergie pokarmowe mogą się ujawnić w każdym wieku, jednak najbardziej narażone na nie są dzieci do drugiego roku życia. Pomimo istniejącego przekonania karmienie piersią w pełni nie zabezpiecza żywionego w ten sposób dziecka przed ujawnieniem się objawów nietolerancji lub alergii pokarmowej. Jednym z najgorzej przyswajalnych czynników pokarmowych jest mleko krowie. Powstawanie u niemowląt objawów alergii na białka mleka, tzw. skazy białkowej, wiąże się z możliwością przenikania alergenów z przewodu pokarmowego matki przez naczynia krwionośne i limfatyczne do gruczołu piersiowego, a stamtąd wraz z mlekiem do układu pokarmowego dziecka. Nabłonek jelita noworodka jest niedojrzały, zarówno morfologicznie, jak i czynnościowo. Utrudnia to prawidłowe trawienie pokarmu oraz sprzyja nadmiernemu przenikaniu alergenów pokarmowych do krwiobiegu dziecka, co wywołuje objawy kliniczne alergii pokarmowej. Przechodzenia alergenów pokarmowych z diety matki do jej mleka dowodzi obecność w nim β -laktoglobuliny mleka krowiego. Istnieją również pewne przesłanki wskazujące na możliwość przechodzenia alergenów pokarmowych z diety matki do organizmu dziecka przez łożysko jeszcze w czasie ciąży, jednak w okresie prenatalnym nie są wskazane żadne drastyczne ograniczenia dietetyczne.

Najczęściej występujące nietolerancje pokarmowe to nietolerancja glutenu, czyli białek gluteniny i gliadyny, zawartych w otoczkach ziaren pszenicy, żyta i jęczmienia (wrodzona autoimmunologiczna nietolerancja glutenu to celiakia, choroba nieuleczalna) i nietolerancja laktozy (cukru mlecznego). Nietolerancja laktozy dotyczy w takim samym stopniu dzieci karmionych sztucznie jak i naturalnie, ponieważ cukier mleczny występuje w mleku wszystkich ssaków, więc w mleku kobiecym również.

Duże znaczenie przy ujawnianiu objawów klinicznych alergii pokarmowej ma działanie niekorzystnych czynników środowiskowych,

np. narażenie na alergenzy wziewne, ekspozycja na dym tytoniowy, zanieczyszczenie środowiska, a także zakażenia wirusowe i bakteryjne. Zakażenia wirusowe, bakteryjne, pasożyty, terapie antybiotykowe sprzyjają powstawaniu nieszczelności w nabłonku jelita cienkiego, które umożliwiają dostawanie się niestrawionych substancji pokarmowych do krwioobiegu i wywołanie odpowiedzi immunologicznej.

Objawy nietolerancji lub alergii pokarmowej ujawniają się najczęściej pomiędzy drugim tygodniem, a trzecim miesiącem życia, w przypadku celiakii w drugim roku życia dziecka, jednak objawy chorobowe mogą pojawić się również u osób dorosłych. Najczęstszymi i najłatwiej obserwowalnymi objawami alergii pokarmowych są zmiany skórne w postaci typowej grudkowatej wysypki, a także pokrzywka i rumień. Zmiany mają tendencję do sączenia oraz swędzenia. Podobnie często występuje odpowiedź ze strony układu pokarmowego, gdzie typowymi objawami są: wymioty, kolki brzuszne, zaparcia oraz biegunki, są to również główne objawy nietolerancji pokarmowych. Nierzadko występują również alergiczne objawy dotyczące układu oddechowego. W tej postaci alergii pokarmowej często występują nawracające zapalenia oskrzeli oraz zapalenia płuc, a także nieżyty nosa, zapalenia ucha i częste przeziębienia, obrzęk górnych odcinków dróg oddechowych, duszności, kaszel, drapanie w gardle. W skrajnych wypadkach niezwykle silnej odpowiedzi immunologicznej może dojść do wstrząsu anafilaktycznego.

Brak jest całkowicie pewnych i jednoznacznych testów ostatecznie potwierdzających nietolerancje i alergię pokarmową. Rozpoznanie możliwe jest dzięki zastosowaniu testu eliminacji i prowokacji. Polega on na obserwacji reakcji organizmu w czasie eliminacji z diety składnika pokarmowego podejrzanego o wywoływanie objawów klinicznych (spodziewane ustąpienie objawów chorobowych) oraz po ponownym wprowadzeniu wyeliminowanego pokarmu do diety (spodziewane powtórne pojawienie się objawów klinicznych). Wyniki testów skórnych często dają mało wiarygodne wyniki, szczególnie u małych dzieci. Miano przeciwciał IgE u dorosłych można oznaczyć np. w testach RAST (ang. *radio-allergosorbent test*), jednakże mogą one służyć jedynie uściśleniu diagnozy

Zalecenia dietetyczne, którym powinny sprostać osoby ze zdiagnozowaną nietolerancją pokarmową, są bardzo restrykcyjne. W przypadku dzieci z nietolerancją pokarmową, które karmione są naturalnie, ograniczenia dietetyczne muszą również objąć dietę ich matki. Przede wszystkim w przypadku małych dzieci należy je jak najdłużej karmić naturalnie. Wstępnie jest wskazane usunięcie z diety wszystkich głównych alergenów pokarmowych (przetwory mleczne, pokarmy zawierające dodatek serwatki, jaja kurze, gluten, kakao, owoce cytrusowe, ryby, owoce morza, cielęcina, wołowina, pomidory, banany, orzechy, soja,

miód), a nie wyłącznie produkty nietolerowane przez dziecko. Jednakże tak drastyczne ograniczenia dietetyczne przyjmuje się tylko i wyłącznie na czas tropienia alergenu. Po czym należy stopniowo wprowadzać do diety kolejne produkty, uważnie obserwując, czy nie pojawiają się objawy chorobowe. Dłuższa eliminacja kluczowych grup produktów bez uzasadnienia klinicznego może doprowadzić do poważnych niedoborów dietetycznych. Całkowicie należy wyeliminować żywność wysoko przetworzoną mogącą zawierać sztuczne dodatki do żywności, np. barwniki, konserwanty, emulgatory, wzmacniacze smaku i zapachu, które to związki mogą nasilać objawy nietolerancji.

Eliminacja produktów alergennych wymaga wprowadzenia w ich miejsce żywności zastępczej o podobnych wartościach odżywczych. Szczególnie jeżeli alergenem jest produkt stanowiący podstawę żywienia zwyczajowego, jak np. pieczywo pszenne, mleko, jajka. W przeciwnym razie może dojść w organizmie do powstania stanów niedoboru niektórych składników odżywczych i pojawienia się objawów chorobowych z nimi związanych. Ponadto białka mleka, suszona serwatka, białka jaja kurzego lub skrobia pszenna są dodawane do wielu produktów spożywczych jako środki funkcyjne, np. emulgatory, stabilizatory lub substancje zwiększające udział protein w produktach żywnościowych. Substancje te są dodawane do m.in. wędlin, pieczywa, słodczy, przetworów warzywnych. Utrudnieniem jest niewielki asortyment hipoalergicznego żywności w sklepach, a poważnym problemem jest brak świadomości wielu producentów żywności, którzy nie zwracają uwagi na odpowiedni dobór składników używanych do produkcji swoich wyrobów i nie zaznaczają, że np. tłuszcz roślinny użyty do wypieku zawiera liofilizowaną serwatkę, żelatyna jest pochodzenia wołowego, a do zagęszczania użyto skrobi pszennej, a nie ziemniaczanej. Brakuje również zaleceń higienicznych, na przykład, by produkty zawierające gluten były przetwarzane w odrębnych pomieszczeniach niż cała pozostała żywność, a sery nie były krojone tymi samymi przyrządami co wędliny. Niewypełnienie bardzo restrykcyjnych wskazówek żywieniowych może negatywnie oddziaływać na zdrowiu osób z alergią lub nietolerancją pokarmową, czego konsekwencje mogą być przezeń odczuwane przez całe życie. Szczególnie częstym zjawiskiem jest rozwiniecie się alergii wziewnych (np. na kurz, pyłki roślin, sierść zwierząt, zarodniki grzybów) u osób, które w dzieciństwie cierpiały z powodu źle traktowanej alergii pokarmowej. Jest to zjawisko tzw. marszu alergicznego. U ok. 3–10% alergicznych dzieci objawy chorobowe alergii pokarmowych mogą trwać również w wieku dorosłym. Jedynym sposobem na uzyskanie tolerancji pokarmowej jest całkowita eliminacja alergenów z diety. W wielu przypadkach konieczność stosowania diety eliminującej dany

produkt trwa od około roku do pięciu lat. W późniejszym okresie żywność zawierająca te produkty może być dobrze tolerowana, o ile nie występuje często i w dużych ilościach. W przypadku glutenu i stwierdzenia zespołu złego wchłaniania powodującego przejściową nietolerancję dieta bezglutenowa musi być zazwyczaj stosowana zaledwie kilka miesięcy. Natomiast jeżeli potwierdzona została celiakia, dieta bezglutenowa musi być stosowana przez całe życie. Nawet jeden pszeniczny opłatek może już wywołać niepożądane objawy.

W ostatnich latach obserwuje się także wzmożoną podatność na alergie pokarmowe u dorosłych osób, u których nigdy wcześniej nie występowały takie symptomy. Brakuje dokładnych badań na ten temat, jednakże przypuszczalnie zjawisko to jest związane z rosnącym zanieczyszczeniem środowiska, niezdrowym trybem życia, zmniejszaniem się odporności organizmu na skutek dbałości o sterylną czystość (zmniejszenie kontaktu z drobnoustrojami, to gorsza stymulacja układu immunologicznego). Dodatkowym czynnikiem jest spożywanie coraz bardziej przetworzonej i zmodyfikowanej chemicznie żywności, zawierającej np. syntetyczne środki stabilizujące, konserwanty, emulgatory, barwniki, zwilżacze, substancje przeciwzbrylające i zagęszczające, wzmacniacze smaku i zapachu, które mogą być odpowiedzialne za wzrost ryzyka nietolerancji pokarmowych. Spośród stosowanych dodatków do żywności reakcje alergiczne wywołują głównie siarczyny (oznaczone symbolami E220–E227) oraz barwniki, takie jak: tartrazyna (E102), żółcień pomarańczowa FCF (E110), czerwień koszenilowa A (E124), erytrozyna (E127) oraz błękit patentowy V (E131). Ponadto obecność w żywności różnego rodzaju zanieczyszczeń: pestycydów, herbicydów, antybiotyków, toksyn mykologicznych, metali ciężkich czy zanieczyszczeń przemysłowych może osłabiać zdolności detoksyfikacyjne organizmu i nasilać objawy alergii pokarmowych.

U osób dorosłych alergie pokarmowe mogą przybrać formę choroby zawodowej, np. u osób dojących krowy, cukierników mających kontakt z mlekiem w proszku, czy u garbarzy wykorzystujących kazeinę w procesie garbowania skór.

Produkty zakazane

w eliminacyjnej diecie bezmlecznej i bezjajecznej:

- mleko,
- jajka w każdej postaci: sadzone, na twardo, na miękko, jajecznicą, omlet,
- cielęcina,
- wołowina,
- wędliny: szynki, pasztety i parówki zawierające cielęcinę, wołowinę lub jajka,

- nabiał (cały!),
- makarony jajeczne,
- masmixy, margaryny,
- pieczywo tostowe,
- chipsy i chrupki aromatyzowane,
- zabielałe zupy,
- naleśniki, racuchy, kluski, kopytka, pierogi ruskie i tym podobne wyroby przygotowane w tradycyjny sposób,
- tradycyjnie przygotowywane desery, kremy, budynie, lody,
- słodczy, wafelki, czekoladki, draże, herbatniki, ciastka, pączki, drożdżówki, biszkopty, kremy czekoladowe do pieczywa, płatki śniadaniowe i musli itd.

Produkty zakazane przy nietolerancji glutenu lub pszenicy:

- pszenica,
- orkisz,
- jęczmień,
- żyto,
- owies (chyba że pochodzi z certyfikowanego źródła, ponieważ ziarna owsa z natury nie zawierają glutenu, jednak tradycyjnie są bardzo silnie zanieczyszczone pszenicą),
- mąka ze zbóż zawierających gluten i wszystkie produkty przygotowane z ich użyciem: pierogi, pyzy, kopytka, naleśniki, ciasta, ciasteczka, wafelki, paluszki, krakersy, drożdżówki,
- pieczywo każde (**chyba że zostało oznaczone jako bezglutenowe**),
- kasza jęczmienna (pęczak, mazurska, perłowa),
- kasza manna, kuskus,
- kaszki błyskawiczne zbożowe i mleczno-zbożowe,
- płatki owsiane (**chyba że pochodzą z certyfikowanego młyna**),
- musli i granole,
- płatki zbożowe,
- bułka tarta,
- lane ciasto,
- makaron pszenny,
- makaron żytni,
- panierki,
- piwo,
- proszek do pieczenia (tradycyjny zawiera dodatek mąki pszennej),
- gotowe sosy, majonezy, ketchupy, jogurty, śmietanki,
- wyroby seropodobne,
- wędliny: szynki, pasztety, parówki, kaszanka, pulpety, hamburgery itd.,

- zasmażka,
- zupy w proszku,
- zupy zagęszczane mąką,
- gotowe produkty spożywcze.

Produktami **naturalnie bezglutenowymi** są: kukurydza, ryż, ziemniaki, soja, proso, gryka, soczewica, fasola, sorgo i wszystkie ich przetwory, orzechy, a także mięso, owoce i warzywa. Za bezglutenowe uznaje się również produkty, w których według ustaleń FAO/WHO zawartość glutenu nie przekracza 20 ppm (20 mg/kg) i oznacza się je międzynarodowym znakiem przekreślonego kłosa.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Ułożenie jadłospisu dla osób z alergią lub nietolerancją pokarmową.

Przed przystąpieniem do wykonywania zadań zapoznaj się ze stronami internetowymi i literaturą dotyczącą poruszanych zagadnień. Sporządź notatki, które mogą być przydatne podczas wykonywania zadań.

Zadanie 1: Wyeliminuj z przykładowego jadłospisu produkty, które mogą zawierać jeden z następujących alergenów:

- 1) gluten,
- 2) jajka,
- 3) nabiał,
- 4) soja,
- 5) cytrusy.

Zaproponuj bezpieczne zamienniki nietolerowanych produktów.

Przykładowy jadłospis:

śniadanie: kromka razowego pieczywa z masłem, szynką, żółtym serem, pomidorem i majonezem, kawa z mlekiem,

obiad: zupa pomidorowa (z przecieru) zabiela z makaronem, kotlet schabowy, ziemniaki ubijane, surówka z selera z sosem jogurtowym, herbata z cytryną,

podwieczorek: wafelek czekoladowy z orzechami, żelki owocowe, sok pomarańczowy,

kolacja: słodka bułka z margaryną, plaster białego sera, parówka cielęca, kiszony ogórek, kubek kakao.

Zadanie 2: Zaplanuj urozmaiconą i zaspokajającą wysokie potrzeby odżywcze (dodatkowe 500 kcal dziennie) dietę dla matki (przykładowo: wzrost 165 cm, waga 60 kg) karmiącej dziecko z nietolerancją pokarmową na mleko i nabiał, cielęcinę i wołowinę oraz jajka. Określ, na jakie niedobory najbardziej będą narażone osoby na takiej diecie?

Następnie spróbuj wyeliminować ze zbilansowanej diety produkty zawierające gluten i soję, jako potencjalne alergeny. Odszukaj informacje o obecności tych składników w produktach spożywczych w Internecie lub literaturze dotyczącej alergii pokarmowych.

Zadanie 3: Zastanów się, jak powinno wyglądać przyrządzanie posiłków dla osób z nietolerancją pokarmową na różnego rodzaju składniki pokarmowe. Przedyskutuj: jakie wymagania powinni spełniać producenci żywności; jakie dania może zamawiać w restauracjach osoba z nietolerancją produktów z zadania 1; jakie problemy może mieć osoba z nietolerancją pokarmową podczas proszonego obiadu?

Zadanie 4: Zapoznaj się z regułami diety eliminacyjnej. Zaprojektuj taką dietę dla osoby, u której istnieje podejrzenie nietolerancji pokarmowej, a która jeszcze nie zidentyfikowała nietolerowanego produktu żywnościowego.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Wojciechowska M., *Choroby alergiczne – epidemia XXI wieku? Ewaluacja kształcenia pielęgniarek i położnych*, Łódź 2008.

Bartuzi Z., *Alergia na pokarmy*, Łódź 2006.

Golińska B., Kurzawa R., *Alergia pokarmowa u dzieci*, Bielsko-Biała 1999.

Jakimowicz-Klein B., *Kuchnia alergików*, Wrocław 2005.

Pediatrica. Podręcznik dla studentów, red. K. Kubicka, W. Kawalec, Warszawa 2003.

9. Zaburzenia przyjmowania pokarmów

prof. dr hab. Barbara Józefik

WSTĘP

Anoreksja i bulimia psychiczna należą do zaburzeń o wieloczynnikowej etiologii. Wśród czynników ryzyka wskazuje się m.in. na znaczenie kontekstu kulturowego. Podkreśla się znaczenie współcześnie promowanego modelu urody i sylwetki kobiecej oraz roli kobiecej, której ważnym atrybutem jest niezależność. Wskazuje się, że szczupłość, zakładająca kontrolę jedzenia, staje się synonimem silnej woli i perfekcjonizmu. Zarazem wskazuje się, że spopularyzowany w ostatnich dziesięcioleciach ideał szczupłej sylwetki jako źródła atrakcyjności, powodzenia i sukcesu występuje w tych kręgach kulturowych, w których istnieje nadprodukcja żywności i reklama zachęcająca do konsumpcji, przy jednoczesnej presji stosowania różnorodnych diet. Ilustruje to sprzeczne przekazy kulturowe i tym samym dylematy jednostki, która stara się sprostać kulturowym oczekiwaniom.

W Polsce od końca lat 80. XX wieku obserwujemy narastanie zaburzeń jedzenia. Wskazują na to zarówno wyniki badań epidemiologicznych, jak i zwiększająca się liczba pacjentów, u których rozpoznaje się jadłowstręt psychiczny i bulimię.

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż znacznie więcej literatury dotyczy anoreksji. Dzieje się tak dlatego, iż jadłowstręt psychiczny został wcześniej wyodrębniony i opisany jako jednostka kliniczna, niż miało to miejsce z bulimią. Ta ostatnia początkowo traktowana była jako objaw współwystępujący w przebiegu *Anorexia nervosa*. Dopiero w 1979 roku w pracy Russella została opisana jako odrębny zespół objawowy, co m.in. stało się podstawą do wydzielenia w 1980 roku bulimii psychicznej jako odrębnej jednostki klinicznej w ramach klasyfikacji DSM III Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego. Obecnie oba zespoły

zaliczane są do grupy zaburzeń odżywiania, kategorii wyodrębnionej zarówno w międzynarodowej klasyfikacji chorób ICD-10 (*Międzynarodowa klasyfikacja chorób, urazów i przyczyn zgonów*), jak i w klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*). Kategoria ta obejmuje zaburzenie wyrażające nieprawidłowy, nietypowy stosunek do jedzenia, z towarzyszącymi temu zjawisku złożonymi objawami natury psychicznej i somatycznej.

Ze względu na duże zróżnicowanie częstotliwości występowania zaburzeń odżywiania u dziewcząt i u chłopców w okresie dojrzewania (10–15 lat) wielu badaczy uznaje anoreksję i bulimię psychiczną za zaburzenie, które jest szczególnie sprzężone z problematyką płci. Jak pisze Paxton¹: „bycie kobietą jest czynnikiem ryzyka dla rozwoju zaburzeń jedzenia”. Warto jednocześnie zauważyć, że przegląd badań obejmujących populację dzieci do lat 13 wskazuje na to, że w tym okresie życia większy procent chłopców cierpi z powodu anoreksji psychicznej. Mieści się on w granicach 19–30%. Zmienia się to w okresie dojrzewania płciowego. Niższą zachorowalność chłopców na anoreksję i bulimię wyjaśnia się mniejszym stresem związanym z dojrzewaniem biologicznym. Wydaje się ponadto, że występujące później niż u dziewcząt dojrzewanie psychiczne sprzyja uzyskiwaniu przez chłopców większego oparcia.

W okresie dojrzewania identyfikujemy największe rozpowszechnienie zaburzeń jedzenia. Ocenia się, że anoreksja psychiczna w populacji młodzieży występuje u 0,5%–1% a bulimia u około 2% (1%–4 %). Maksymalne nasilenie zachorowań przypada na 15–18 rok życia.

Poszukując wyjaśnień narastania zaburzeń jedzenia w okresie dorastania, zwraca się uwagę na fakt, iż jest to faza normatywnego kryzysu. Kryzys ten wynika z burzliwie zachodzących przemian dokonujących się w płaszczyźnie biologicznej, psychologicznej i społecznej. Zmieniające się ciało sprawia, że szczególnie dziewczęta koncentrują uwagę na własnym organizmie i jego funkcjonowaniu. Często towarzyszy temu poczucie niepewności co do własnej atrakcyjności, a obszarem szczególnej wrażliwości staje się ciężar ciała.

Zaburzenia jedzenia występują również po okresie dorastania. Rozpowszechnienie anoreksji psychicznej u osób dorosłych mieści się w przedziale pomiędzy 0,2%–0,8 % a bulimii w granicach 0,7%–1,3%. Bulimia występuje często u kobiet, które wcześniej stosowały bez większego powodzenia diety odchudzające. Zaburzenia jedzenia w okresie dorosłości mogą być związane z ciążą lub porodem: zmiany ciała występujące w ciąży, konieczność modyfikacji diety mogą prowadzić niekiedy do lęku przed

¹ Zob. Paxton S., *Individual and risk factors and socio-cultural context for eating disorders*, [w:] *The enculturated body. Policy implications for healthy body image and disordered eating behaviours*, red. D. Gaskil, F. Sanders, Brisbane 2000, s. 24–33.

utrata kontroli. Sytuacja ta może być początkiem powtarzających się epizodów objadania się i ograniczania jedzenia. Zaburzenia jedzenia, jakkolwiek rzadko, mogą wystąpić także po okresie przekwitania.

Poszukiwanie czynników ryzyka dla zaburzeń odżywiania obejmuje wiele obszarów. Dotyczy czynników biologicznych oraz cech osobowości przyszłych pacjentów, analizą obejmuje się wydarzenia życiowe, sytuację rodzinną, funkcjonowanie w relacjach rówieśniczych i środowisku szkolnym, zwraca się uwagę na oczekiwania społeczne oraz szeroko rozumiane czynniki społeczno-kulturowe.

Wyniki badań ujawniły, że grupą o zwiększonym ryzyku zachorowania na anoreksję są dziewczęta i młode kobiety, których kariera zawodowa związana jest koniecznością utrzymywania szczupłej sylwetki i kontrolą swojego ciała. Dotyczy to szczególnie modelek, tancerek, uczennic szkół baletowych, niekiedy osób uprawiających takie dyscypliny sportu jak gimnastyka czy pływanie. Także silna potrzeba osiągnięć okazała się czynnikiem ryzyka. Mówi się o tzw. perfekcjonizmie klinicznym, wskazując, iż stanowi on istotny czynnik ryzyka dla zaburzeń odżywiania się. U jego podstaw leży dysfunkcyjny model samooceny oparty na wysokich wymaganiach i osiągnięciach. Cechuje go powiązanie samooceny z dążeniem do odniesienia sukcesu, głęboki strach przed porażką, samokrytycyzm i negatywna samoocena oraz zaburzenia poznawcze.

Otyłość występująca w okresie przedchorobowym u dziewcząt lub u członków ich rodziny to kolejny istotny czynnik ryzyka. Kulturowy nakaz szczupłości koncentruje uwagę na sylwetce, gdyż jest to najbardziej widoczny aspekt atrakcyjności fizycznej, ale dodatkowo nasila krytyczny stosunek do otyłości. Bycie otyłym dzieckiem jest związane doświadczeniem odrzucenia i wrogości rówieśników, co sprawia, że upragnione staje się bycie osobą chudą.

Sytuacja rodzinna pacjentów z zaburzeniami jedzenia jest także rozpatrywana jako możliwy czynnik ryzyka. Dane demograficzne zdają się wskazywać na wyższy wiek rodziców w momencie urodzenia przyszłej pacjentki. Z analizy demograficznej wynika, iż wskaźnik rozwodów czy niepełnych rodzin wśród rodzin z zaburzeniami jedzenia jest niższy niż w ogólnej populacji, znacząco częściej występują natomiast zaburzenia jedzenia u bliskich członków rodziny oraz choroby afektywne. Porównanie grupy rodziców pacjentów z bulimią z rodzicami pacjentów anorektycznych ujawnia częstszą historię otyłości w grupie pierwszej. W rodzinach tych znajdowano również więcej poważnych chorób somatycznych, a także nadużywanie alkoholu u ojców. Pewien styl funkcjonowania rodzin może zwiększać prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń jedzenia zarówno u dziewcząt, jak i u chłopców. Wśród tych cech autorzy wymieniają konflikty rodzinne, nasiloną kontrolę, niską spójność, ograniczenie autonomii, trudności w wyrażaniu uczuć.

Wieloczynnikowe rozumienie etiologii anoreksji i bulimii psychicznej ma znaczenie dla konstruowania standardów programów leczniczych dla pacjentów z zaburzeniami odżywiania. Z założenia leczenie powinno być kompleksowe i uwzględniające problemy powiązane z rozwojem osobowości pacjentek, z kontekstem rodzinnego i społecznego funkcjonowania oraz powinno obejmować stronę somatyczną, ze względu na występujące w przebiegu choroby zaburzenia somatyczne i hormonalne.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Zwiększenie wiedzy o schorzeniach przyjmowania pokarmu. Zaplanowanie działań profilaktycznych i akcji promocji zdrowia.

Zadanie 1: Zaproponuj, jak można skutecznie promować profilaktykę przeciw anoreksji i bulimii? Jakimi drogami najlepiej dotrzeć do osób zagrożonych takimi schorzeniami? W jaki sposób można zmienić nawyki oraz kreować zdrowe wzorce? Odszukaj w Internecie kampanie zwiększające świadomość społeczną na problemy tych schorzeń i zastanów się nad ich skutecznością. Zastanów się, w jaki sposób anorektycy mogą oszukiwać swoje otoczenie, ukrywając chorobę? W jaki sposób zwrócić uwagę rodziców i uwrażliwić ich na zagrożenia dotyczące ich dzieci?

Zadanie 2: Ortoreksja (*Orthorexia nervosa*) to termin wprowadzony w 1997 roku przez dra Stevena Bratmana. Zaburzenie to charakteryzuje się maniacką obsesją na punkcie zdrowego żywienia. Rozwój zazwyczaj zaczyna się pragnieniem przezwyciężenia chronicznych chorób lub też skorygowania złych nawyków żywieniowych. Jednakże dążenie do doskonałości w odżywianiu ortorektyków pochłania coraz więcej czasu, aż do stadium, kiedy to samo planowanie żywienia i sposobu przygotowania pokarmu staje się dla chorych sensem życia.

Przeprowadź ankietę badającą problem zaburzeń przyjmowania pokarmu wśród przynajmniej 20 osób z różnych środowisk oraz w różnych przedziałach wiekowych. Zastanów się, jakie cechy charakteryzują osoby z zaburzeniami przyjmowania pokarmu. Jakie grupy osób wydają się najbardziej zagrożone wystąpieniem zaburzeń w odżywianiu się?

Czy spędzasz więcej niż trzy godziny dziennie, myśląc o zdrowym jedzeniu?

Czy planujesz to, co będziesz jadł na kilka dni wcześniej?

Czy wartość odżywcza posiłków jest dla ciebie ważniejsza niż sama przyjemność wynikająca z jedzenia?

Czy wraz ze wzrostem jakości twojej diety jakość twojego życia obniżyła się?

Czy stałeś się dla siebie bardziej wymagający?

Czy rezygnujesz z rzeczy, które dawniej sprawiały ci przyjemność na rzecz sposobu odżywiania się, który uważasz za prawidłowy?

Czy czujesz do siebie większy szacunek, kiedy jesz zdrowe rzeczy?

Czy patrzysz z góry na tych, którzy jedzą inaczej niż ty?

Czy czujesz się winny, gdy zjesz coś, co ci smakuje, a co jest niedozwolone w twojej diecie?

Czy twoje zasady żywieniowe dystansują cię od rodziny i przyjaciół?

Czy doświadczasz uczucia spokoju i kontroli, gdy jesz zgodnie z narzuconymi sobie zasadami?

Więcej niż cztery twierdzące odpowiedzi wskazują na możliwość występowania problemów z żywieniem.

Zastanów się, jakie zaburzenia mogłyby pomóc zdiagnozować ta ankieta?

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Anoreksja i bulimia psychiczna. Rozumienie i leczenie zaburzeń odżywiania się, red. B. Józefik, Kraków 2006.

Starzomska M., *Anoreksja. Trudne pytania*, Kraków 2006.

Ziółkowska B., *Anoreksja od A do Z. Poradnik dla nauczycieli i wychowawców*, Kraków 2005.

Abraham S., Llewelyn-Jones D., *Bulimia i anoreksja. Zaburzenia odżywiania*, tłum. W. Rolski, M. Rolska, Warszawa 2004.

Wolska M., *Zaburzenia odżywiania się w perspektywie kulturowej i społecznej*, [w:] *Anoreksja i bulimia psychiczna...*, op. cit., s. 104–114.

Paxton S., *Individual and Risk Factors and Socio-cultural Context for Eating Disorders*, [w:] *The Enculturated Body. Policy Implications for Healthy Body Image and Disordered Eating Behaviours*, red. D. Gaskil, F. Sanders, Brisbane 2000, s. 24–33.

Bratman S., Knight D., *Health Food Junkies: Orthorexia Nervosa – the Health Food Eating Disorder*, New York 2000.

Russell, Gerald (August 1979). *Bulimia nervosa: an ominous variant of anorexia nervosa* 9 (3). *Psychological Medicine*, s. 429–48.

10. Wpływ sposobu odżywiania na ryzyko chorób nowotworowych

WSTĘP

Obserwowany wzrost zachorowania na nowotwory w pewnych rejonach świata wydaje się związany w dużej mierze z niewłaściwym odżywianiem. Szacuje się, że zaledwie 1% przypadków nowotworów wynika bezpośrednio z przyczyn genetycznych, zaś 70–90% wszystkich przypadków nowotworów spowodowanych jest czynnikami środowiskowymi. W tym 30–35% przypadków wiąże się z paleniem tytoniu. 15–20% to wynik specyficznej ekspozycji (np. na wirusy, toksyny przemysłowe) w interakcji z genomem. Ponad 30% zachorowań związane jest z nieprawidłowym żywieniem. Dotyczy to zarówno kaloryczności posiłków przekraczających dziennie zapotrzebowanie energetyczne, niewłaściwej proporcji pomiędzy składnikami odżywczymi, jak i niewystarczającej podaży witamin i składników mineralnych. W obserwowanej zależności istotną rolę odgrywa także zawartość genotoksycznych związków – takich jak heterocykliczne aminy aromatyczne czy wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, zawartych głównie w mięsie i produktach mięsnych – które powstają podczas procesów przygotowujących mięso do spożycia, głównie podczas grillowania i smażenia oraz peklowania. Związki te, jeśli nie zostaną zdetoksyfikowane przez układy enzymatyczne, powodują uszkodzenia w DNA komórek, co w konsekwencji może prowadzić do transformacji nowotworowej. Efektywność detoksyfikacji zależy przede wszystkim od aktywności enzymów, kodowanych przez polimorficzne geny. Aktywność tych enzymów może być modyfikowana przez związki polifenolowe zawarte w warzywach i owocach. W produktach roślinnych dużą rolę w ochronie komórek przed uszkodzeniami

DNA odgrywają zawarte w nich związki antyoksydacyjne (w tym witaminy), które usuwają powstające wolnorodnikowe produkty pośrednie powstające w metabolizmie związków genotoksycznych. A także pierwiastki wchodzące w skład enzymów przeciwutleniających, detoksyfikacyjnych i naprawczych. Badania epidemiologiczne pokazują, że zachorowalność na nowotwory dietozależne jest istotnie niższa w krajach śródziemnomorskich w porównaniu do krajów środkowej i północnej Europy, przy równoczesnych różnicach w trybie odżywiania w tych rejonach. Rolę konkretnych składników odżywczych w procesach nowotworowych omówiono w rozdziale 15.

Informacje na temat poziomu spożycia produktów spożywczych i grup produktów w kilkudziesięciu krajach świata przeliczone na dzień i na osobę, są dostępne w bazie FAO (ang. Food and Agriculture Agency of the United Nations) (www.fao.org/statistics). Wielkość spożycia tych produktów została także przeliczona na poziom spożycia białka, węglowodanów oraz tłuszczu, a także na ilość spożywanej dziennie energii oraz udziału w niej tych podstawowych składników spożywczych. Dane obejmują okres od 1969 do 2012 roku i ciągle są uzupełniane.

Dane dotyczące śmiertelności i zapadalności na różne nowotwory w wielu krajach świata gromadzone są od kilkunastu lat i można je znaleźć w bazie danych GLOBOCAN prowadzonej przez Międzynarodową Agencję Badania nad Nowotworami (ang. International Agency for Research on Cancer, IARC).

Korzystając z tych danych, można wyznaczyć zależności między sposobem odżywiania się populacji a ryzykiem występowania chorób nowotworowych.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Nauczenie się stawiania hipotez badawczych i ich weryfikowania. Do wykonania analiz zostaną użyte dane zawarte w bazach danych umieszczonych na stronach internetowych FAO (www.fao.org) oraz IARC (www.iarc.fr), baza GLOBOCAN (globocan.iarc.fr).

Zadanie 1: Zapoznaj się z opisanymi bazami danych, aby móc je następnie wykorzystywać do rozwiązywania postawionych w późniejszych zajęciach hipotez.

Zadanie 2: Zapoznaj się z artykułem (M. Kapiszewska, *A vegetable to meat consumption ratio as a relevant factor determining cancer preventive diet. The mediterranean versus other european countries*, "Forum of Nutrition". vol. 59, 2006, s. 130–153) weryfikującym hipotezę: „im wyższy jest stosunek spożycia warzyw i owoców do mięsa i produktów mięsnych, tym mniejsze jest ryzyko nowotworów okrężnicy, piersi i prostaty”. Zapoznaj się z danymi dostępnymi w Internecie, które wykorzystano w tej publikacji.

Po przeczytaniu, napisz opracowanie tego zagadnienia nie dłuższe niż 1 000 słów (około dwie strony) składające się z ośmiu paragrafów:

- 1) streszczenie projektu,
- 2) cel naukowy projektu,
- 3) hipotezy badawcze,
- 4) znaczenie projektu,
- 5) istniejący stan wiedzy w zakresie tematu badań,
- 6) metodyka zastosowanych badań (niezbędnie jest posiadanie wiedzy z zakresu statystycznej analizy danych),
- 7) uzyskane wyniki,
- 8) wnioski i podsumowanie.

Zadanie 3: Zweryfikuj następującą hipotezę:

„Ryzyko nowotworów okrężnicy (ang. *Colon cancer*) zależy od poziomu spożycia produktów mięsnych”.

1. Oceń związki pomiędzy zachorowalnością na nowotwory okrężnicy zdiagnozowane w wybranym roku (GLOBOCAN) dla określonego kraju, a poziomem spożycia produktów mięsnych we wszystkich krajach Europy w latach poprzedzających wybrany rocznik (skorzystaj z zestawień znajdujących się w bazie danych FAO <http://www.fao.org/statistics/databases/en/> w zakładce *FAO's Corporate database* http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/*/E). Oblicz średni poziom spożycia produktów mięsnych w wybranym okresie i sprawdź, czy wpływa on na ryzyko zachorowania na raka okrężnicy w populacji badanego kraju. W dodatkowych analizach weź także pod uwagę poziom spożycia różnych rodzajów mięsa.
2. Sprawdź, czy w zachorowalności na ten nowotwór ma znaczenie:
 - a) procentowy udział produktów zwierzęcych w energii,
 - b) udział tłuszczu z tych produktów,
 - c) udział białek z tych produktów.
3. Napisz opracowanie nie dłuższe niż 1000 słów według schematu zamieszczonego w zadaniu 2.

Zadanie 4: Stosując bazy danych, sformułuj samodzielnie projekt badawczy, a następnie rozwiąż go. Napisz opracowanie. Możesz skorzystać z baz FAO i GLOBOCAN lub innych oficjalnych danych dostępnych w Internecie.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Łomnicki A., *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*, Warszawa 2014.

Dobek A., Szwaczkowski T., *Statystyka matematyczna dla biologów*, Poznań 2007.

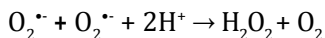
11. Oznaczanie potencjału antyoksydacyjnego materiału biologicznego metodą FRAP

WSTĘP

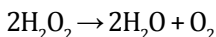
Stres oksydacyjny jest stanem organizmu (komórki, organów, tkanek) charakteryzującym się podwyższonym poziomem wolnych rodników i/lub reaktywnych form tlenu w porównaniu do możliwości antyoksydacyjnych organizmu, których miarą jest potencjał antyoksydacyjny.

Wolne rodniki oraz reaktywne formy tlenu (RFT lub ROS – ang. *reactive oxygen species*) powstają zarówno na drodze metabolizmu komórkowego, jak i dostają się do organizmu ze środowiska. Do RFT należą: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$), rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\cdot}), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}) oraz tlen singletowy (1O_2), ozon (O_3) i nadtlenek wodoru (H_2O_2).

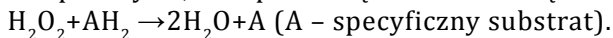
Sprawne układy antyoksydacyjne zapewniają homeostazę między poziomem powstających wolnych rodników a szybkością ich usuwania z organizmu. Należą do nich małe cząsteczki o własnościach zmiatania wolnych rodników, takie jak: kwas askorbinowy, karotenoidy, tokoferole, polifenole roślinne, glutation oraz obecne w organizmie enzymy przeciwutleniające, np. transferaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydazy. Te trzy ostatnie enzymy są często nazywane „przeciwutleniającą triadą”, stanowiącą wydajny układ zabezpieczający komórkę przed działaniem RFT. Dysmutaza ponadtlenkowa przekształca anionorodnik ponadtlenkowy w cząsteczkę nadtlenu wodoru:



Następnie nadttlenek wodoru jest rozkładany przez katalazę do wody i tlenu:



lub przez układ peroksydaz, które przenoszą tlen na inne związki:



Drobnocząsteczkowe przeciwutleniacze reagują bezpośrednio z formami rodnikowymi. Mają one niższą specyficzność niż enzymy, dlatego też są bardziej uniwersalne. Przeciwutleniacze drobno cząsteczkowe są aktywne zarówno w fazie wodnej (kwas askorbinowy), jak i lipidowej (tokoferole, karotenoidy). Związki fenolowe, w zależności od budowy, mogą przejawiać aktywność antyoksydacyjną w środowisku polarnym i hydrofobowym.

Rolę przeciwutleniaczy bezpośrednio pełnią składniki odżywcze: witaminy C i E, karotenoidy oraz roślinne polifenole (w tym flawonoidy). Natomiast komórkowe systemy antyoksydacyjne pośrednio zależą od składników odżywczych. Jony niektórych metali (Cu, Mn, Zn, Fe), mikroelementów dostarczanych z pokarmem, znajdują się w centrach aktywnych enzymów odpowiedzialnych za inaktywację reaktywnych form tlenu (katalazy, dysmutazy). Ponadto składniki dietetyczne stanowią kofaktory enzymów uczestniczących w licznych procesach redoks (ryboflawina, nikotynamid). Stąd niedobory składników odżywczych mogą prowadzić do zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w komórkach i wywołania stanu stresu oksydacyjnego.

Suma działania wszystkich przeciwutleniaczy składa się na potencjał antyoksydacyjny, którego siła może ulegać zmianie w zależności od stężenia przeciwutleniaczy oraz aktywności enzymów. Niewystarczająca obrona przed stresem oksydacyjnym wpływa na stan fizjologiczny organizmu, prowadząc często do rozwinięcia lub nasilenia stanu chorobowego. Zjawisko to ma miejsce głównie w chorobach przewlekłych, takich jak: cukrzyca, miażdżyca, choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, Parkinsona), AIDS czy zapalenie wątroby. Stres oksydacyjny może być indukowany przez zanieczyszczenia środowiska, dym tytoniowy i picie alkoholu czy przedłużający się okres niewłaściwego odżywiania.

Niekontrolowany wysoki poziom stresu oksydacyjnego prowadzi do uszkodzenia struktur i składników komórkowych: kwasów nukleinowych, białek, tłuszczów. Dlatego też pomiar jego wielkości może być wskazówką o stanie zagrożenia organizmu, a także może być stosowany do oceny skuteczności jego zmniejszenia przy zastosowaniu na przykład „diety antyoksydacyjnej” zawierającej przeciwutleniające składniki żywieniowe lub suplementy dietetyczne. Potencjał antyoksydacyjny można mierzyć w układach doświadczalnych *in vitro*, jak i w płynach

ustrojowych, np. ślinie, surowicy krwi. Może także służyć do oceny zdolności antyoksydacyjnych różnych substancji, np. soków owocowych.

Jedną z prostych metod wyznaczenia potencjału przeciwutleniającego jest technika FRAP (ang. *ferric reducing ability of plasma* lub *ferric reducing antioxidant power*). Zdolności zmiatania rodników definiowane są w literaturze anglojęzycznej bardzo różnorodnie na przykład: TAC – *total antioxidant capacity*, TRAP – *total peroxy radical-trapping antioxidant parameter*, TRAP – *total redox antioxidant potential*, ORAC – *oxygen radical absorbance capacity*, TEAC – *Trolox equivalent antioxidant capacity*, TAR – *total antioxidant reactivity*.

Metoda wyznaczania tego potencjału polega na ocenie zdolności plazmy czy osocza do zredukowania obecnych w roztworze reakcyjnym jonów żelaza III do jonów żelaza II. Zredukowane jony Fe^{2+} są kompleksowane przez TPTZ (2,4,6-tripirydy-s-triazyna). Utworzenie tego kompleksu powoduje zmianę barwy roztworu z żółtej na niebiesko-fioletową. Intensywność zabarwienia, mierzona kolorymetrycznie przy świetle o fali długości 590 nm, zależy liniowo od ilości jonów żelaza II.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL

Określenie potencjału przeciwutleniającego różnych rodzajów soków i herbat oraz porównanie wartości potencjału przeciwutleniającego śliny pobranej od zdrowych wolontariuszy.

WYKONANIE ĆWICZENIA

obejmuje: przygotowanie odczynników, sporządzenie roztworów do wyznaczenia krzywej standardowej, przygotowanie badanych próbek (soki, herbata, ślina), przeprowadzenie reakcji, analizę wyników. Do przeprowadzenia zajęć potrzebny jest spektrofotometr.

POTRZEBNE ODCZYNNIKI

- 1 mM FeSO_4 ,
- 20 mM FeCl_3
- 10 mM chlorowodorek TPTZ (2,4,6-Tripirydylo-s-Triazyny)
- 300 mM bufor octanowy (pH=3,6),
- woda redestylowana,
- soki owocowe, herbata zielona, herbata czarna, ślina

WYKONANIE KRZYWEJ STANDARDOWEJ

Do sporządzenia roztworu reakcyjnego potrzebne są następujące odczynniki:

- roztwór FRAP1 (sposób przygotowania – tabela 16),
- seria rozcieńczeń FeSO_4 (sposób przygotowania – tabela 17).

Tabela 16. Przygotowanie roztworu FRAP1.

Odczynnik	Objętość [ml]
Bufor octanowy	20,875
TPTZ	2,05

W celu wyznaczenia krzywej standardowej przygotuj szereg rozcieńczeń 1 mM roztworu siarczanu żelaza FeSO_4 (patrz tabela 17). Rozcieńczenia należy przygotowywać przed samym pomiarem, ponieważ FeSO_4 ulega utlenieniu w kontakcie z powietrzem.

Tabela 17. Seria rozcieńczeń 1 mM FeSO_4 potrzebnych do wykonania krzywej standardowej.

FeSO_4 [ml]	ddH_2O [ml]	Końcowe stężenie FeSO_4 [mM]
–	1	0
0,1	0,9	0,1
0,2	0,8	0,2
0,3	0,7	0,3
0,4	0,6	0,4
0,5	0,5	0,5
0,6	0,4	0,6
0,7	0,3	0,7
0,8	0,2	0,8
0,9	0,1	0,9
1	–	1

Źródło: opracowanie G. Zajęc.

Do dołków na płytce 96-dołkowej odpipetuj po 200 μl przyrządzonego roztworu FRAP1 (tabela 16). Po czym natychmiast dodaj 16,5 μl kolejnych rozcieńczeń FeSO_4 do kolejnych dołków (pamiętając o wykonaniu duplikatów pomiarów). Delikatnie zmieszaj roztwory przez poruszanie zamkniętą płytką, a następnie umieść płytkę w ciemności na 20 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wstaw do spektrofotometru i odczytaj absorbancję przy fali o długości 593 nm.

Analiza danych: sporządź wykres zależności pomiędzy absorancją a stężeniem FeSO_4 – czyli tzw. krzywą standardową. Wielkość potencjału antyoksydacyjnego badanych próbek będziesz odczytywać z wyznaczonej krzywej przez odnalezienie na niej wartości absorancji zmierzonych dla próbek i odczytania odpowiadającej im wartości stężenia równoważnego FeSO_4 .

POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY WYBRANYCH ROZTWORÓW

1. EKSTRAKTY OWOCOWE

Sporządź roztwór FRAP2 według tabeli 18.

Tabela 18. Sporządzanie roztworu FRAP2.

Odczynnik	Objętość [ml]
Bufor octanowy	20,875
TPTZ	2,05
FeCl_3	2,05

Źródło: opracowanie G. Zajac.

Do jednej serii probówek odpipetuj po 900 μl wody. Do drugiej serii probówek odpipetuj po 900 μl metanolu. Przygotuj przynajmniej trzy rodzaje pulpy ze świeżych owoców i dodaj po 100 μl pulpy owocowej do probówki z wodą i do probówki z metanolem. Wytrząśnij krótko na wortexie. Pozostaw na godzinę w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Odwiruj przez 5 min ($4\,000 \times \text{rpm}$). Na płytkę 96-dołkową odpipetuj po 200 μl roztworu FRAP2 na dołek, a następnie dodaj 16,5 μl nadsączów z owoców. Pamiętaj o sporządzeniu duplikatu każdego pomiaru oraz o sporządzeniu próbek ślepych – zamiast próbki badanej dodaj wodę redestylowaną. Po 20 min inkubacji w temperaturze pokojowej (bez dostępu światła) zmierz absorancję próbek przy fali długości 593 nm.

2. HERBATY

Do 1 g herbaty wlej 100 ml wrzątku i zamieszaj. Po 3 min odpipetuj 16,5 μl naparu do dołków w płytce 96-dołkowej, w których znajduje się po 200 μl roztworu FRAP2. Pamiętaj o sporządzeniu duplikatu każdego pomiaru oraz o sporządzeniu próbek ślepych. Po 20 min pozostawienia w ciemności zmierz absorancję przy fali długości 590 nm.

Określ siłę antyoksydacyjną dla frakcji wodnej soku i dla frakcji metanolowej. Porównaj siłę antyoksydacyjną soków oraz herbaty, stosując tak zwane stężenie równoważne FeSO_4 .

3. ŚLINA

Za pomocą saliwetek należy pobrać po około 100 μl śliny do probówek typu eppendorf (po uprzednim dokładnym wypłukaniu ust wodą destylowaną). Probówki należy odwirować przez 5 min ($11\,000 \times \text{rcf}$). Na płytkę 96-dołkową nałożyć po 200 μl roztworu roboczego FRAP2 (2 dołki na próbkę śliny plus 2 dołki na próbę ślepa – razem 4 dołki na osobę), a następnie do dołków nałożyć po 16,5 μl nadsącza z próbek śliny.

UWAGA! Należy pracować w rękawiczkach i zachować najwyższą ostrożność. Płyny ustrojowe mogą stanowić materiał zakaźny. Każdy powinien pracować z własną próbką.

Przy opracowaniu wyników należy od próbki właściwej odjąć „tło” próbki ślepej.

4. ROZTWORY ANTYOKSYDANTÓW

Przygotuj etanolowe roztwory następujących związków: kwercetyna, kurkumina, rutyna, katechina, β -karoten oraz wodne roztwory kwasu askorbinowego i troloxu w zakresie stężeń od 1 μM –250 μM . Wykonaj oznaczenie potencjału antyoksydacyjnego jak w poprzednich punktach.

Zadanie 1: OPRACOWANIE WYNIKÓW

wyniki należy zebrać w tabeli,

należy wykreślić, używając dowolnego arkusza kalkulacyjnego, krzywą standardową zależności absorbancji od stężenia siarczanu żelaza.

Rycina 13. Przykładowa krzywa standardowa w metodzie FRAP.



Źródło: opracowanie G. Zajęc.

Do wykreślonej krzywej standardowej należy odnieść wyniki absorbancji z wszystkich eksperymentów.

Zadanie 2: Porównaj i przedyskutuj wyniki otrzymane dla wszystkich osób uczestniczących w ćwiczeniu.

Zadanie 3: Przedyskutuj, skąd biorą się różnice pomiędzy różnymi ekstraktami, weź pod uwagę rodzaj owoców. Wyjaśnij różnice pomiędzy frakcją wodną i frakcją metanolową?

Zadanie 4: Opisz różnicę w wartościach FRAP wyznaczonych dla zielonej i czarnej herbaty. Sprawdź zawartość i rodzaj flawonoidów w różnych gatunkach herbat w bazie danych na stronie internetowej Food and Nutrition Information Center Amerykańskiego Departamentu Rolnictwa (<http://fnic.nal.usda.gov/food-composition/individual-macronutrients-phytonutrients-vitamins-minerals/phytonutrients>). Więcej informacji o flawonoidach znajdziesz w rozdziale 12.

Zadanie 5: Stosując słowa kluczowe w bazie danych Pubmed Central / Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>: antioxidant activity and dietary antioxidants and polyphenols), wybierz artykuł do omówienia. W celu wyszukania artykułów należy w polu wyszukiwania wpisać całą podkreśloną wyżej frazę (łącznie z operatorami logicznymi *and*).

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Warszawa 2008.

Szeto Y.T., Tomlinson B., Benzie I.F.F., *Total Antioxidant and Ascorbic Acid Content of Fresh Fruits and Vegetables: Implications for Dietary Planning and Food Preservation*, "British Journal of Nutrition" 2002, nr 87, s. 55–59.

Firuzi O., *et al.*, *Evaluation of the Antioxidant Activity of Flavonoids by "Ferric Reducing Antioxidant Power" Assay and Cyclic Voltammetry*, "Biochimica et Biophysica Acta" vol. 1721, 2005, nr 1–3, s. 174–184.

Benzie I.F.F., Strain J.J., *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power”. The FRAP Assay*, "Analytical Biochemistry", vol. 239, 1996, nr 1, s. 70–76.

12. Flawonoidy

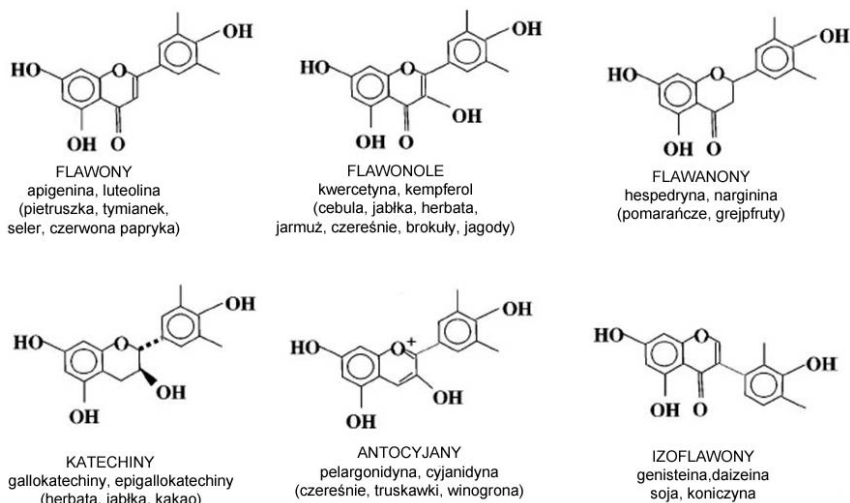
dr Agnieszka Cierniak

WSTĘP

Flawonoidy są to związki polifenolowe pochodzenia roślinnego. Do tej pory zidentyfikowano i opisano ponad 9 000 takich związków. Flawonoidy pełnią różnorodne funkcje: antybiotyków, fungicydów, herbicydów, chronią roślinę przed promieniowaniem UV, są inhibitorami transportu auksyn, biorą udział w przywabianiu owadów, nadają roślinie intensywne barwy (żółta, czerwona, niebieska, fioletowa) i smak. Zlokalizowane są głównie w warstwach powierzchniowych roślin np. w skórce owoców, powierzchni łodyg, w łupinie zbóż (przy produkcji mąki są tracone). Podstawowym elementem strukturalnym cząsteczek flawonoidów jest układ dwóch pierścieni aromatycznych, połączonych mostkiem trójwęglowym ($C_6-C_3-C_6$). Mostek ten w większości flawonoidów jest przekształcony w pierścień heterocykliczny zawierający tlen. Ze względu na różnice budowy pierścienia heterocyklicznego flawonoidy możemy podzielić na sześć podgrup: flawony, flawonole, flawanony, katechiny, antocyjany, izoflawony (Źródło: opracowanie A. Cierniak).

Spośród flawonoidów najintensywniej zabarwione są antocyjanidyny – barwniki kwiatów, owoców i liści wielu gatunków roślin. Są odpowiedzialne za barwy od różowej przez czerwoną do niebieskiej i fioletowej. Antocyjany występują w całym świecie roślin (z wyjątkiem glonów, kaktusowatych oraz komosowatych). Tabela 19 przedstawia owoce i warzywa będące bogatymi źródłami antocyjanów. Stężenie tych związków w owocach związane jest ze stopniem ich dojrzałości i najczęściej rośnie w miarę dojrzewania owocu.

Rycina 14. Wzór chemiczny sześciu klas flawonoidów, przedstawiciele i źródła występowania



Źródło: opracowanie A. Cierniak.

Tabela 19. Występowanie antocyjanów w owocach jadalnych

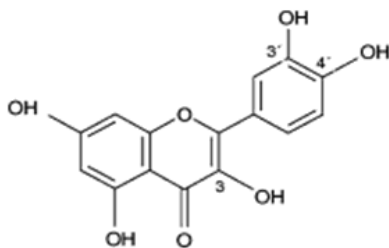
Warzywa i owoce	Stężenie antocyjanów (mg/kg świeżej masy)
Aronia	5 060–10 000
Bakłażan	7 500
Bez czarny	2 000–10 000
Borówka	825–4 200
Borówka brusznica	1 000
Cebula	do 250
Ciemne winogrona	300–7 500
Czarna porzeczka	1 300–4 000
Czereśnia	20–4500
Czerwona kapusta	250
Jeżyna	1 150
Malina	100–600
Rabarbar	do 2 000
Śliwka	20–250
Tarnina	1 600
Truskawka	150–350
Żurawina	600–2 000

Źródło: opracowano wg United States Department of Agriculture, National Nutrient Database.

Niektóre z barwników antocyjanowych są dla ludzkiego oka niewidoczne, lecz ponieważ maksimum ich absorpcji przypada na ultrafiolet, są widzialne dla owadów i ptaków, często tworząc na płatkach kwiatów wzory umożliwiające szybką lokalizację centrum kwiatu. Z drugiej strony antocyjany, pochłaniając promieniowanie UV, chronią tkanki rośliny przed jego szkodliwym wpływem.

Z kolei flawonole odpowiadają (obok karotenoidów) za żółtą barwę kwiatów. Najbardziej rozpowszechnionym flawonoidem występującym w produktach spożywanych przez człowieka w naszej strefie klimatycznej jest kwercetyna (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon). Stężenie kwercetyny w kawie, czekoladzie, mleku, białym winie i piwie wynosi poniżej 1 mg/l, w czerwonym winie 4–16 mg/l, w soku winogronowym 7–9 mg/l, w herbacie 10–25 mg/l, a największa jej ilość występuje w cebuli (284–486 mg/kg) i jabłkach (20–263 mg/kg).

Rycina 15. Wzór strukturalny kwercetyny



Źródło: opracowanie A. Cierniak.

Głównym źródłem flawonoidów w diecie człowieka są owoce, warzywa, czekolada, kawa, kakao, herbata, piwo i czerwone wino. Wielkość spożycia flawonoidów różni się znacznie w poszczególnych populacjach w zależności od zwyczajów żywieniowych. Na przykład w USA spożycie flawonoidów wynosi 500–1100 mg dziennie, a w Holandii 23 mg dziennie.

Metabolizm flawonoidów w organizmie ssaków nie jest jeszcze do końca poznany. Flawonoidy są lepiej wchłaniane w postaci aglikonów (forma wolna) niż formy połączone z resztą cukrową. Biodostępność form glikozydowych flawonoidów z pożywienia zależy od wielkości i różnorodności grup cukrowych przyłączonych do pierścienia fenolowego. Glikozydy, które nie zostały przyswojone w jelicie cienkim, dostają się do jelita grubego, gdzie są hydrolizowane do aglikonów przez endogenną florę bakteryjną ze znacznie większą wydajnością niż enzy-

my produkowane przez komórki ludzkie. Po wchłonięciu do krwiobiegu głównym miejscem, w którym zachodzą przemiany biochemiczne flawonoidów, jest wątroba – tu flawonoidy ulegają reakcjom metylacji (przez O-metylotransferazę katecholową COMT), hydroksylacji i/lub glikozylacji.

Po licznych przemianach biochemicznych, które zaszły w wątrobie, metabolity flawonoidów w postaci sprzęgniętej z białkami, głównie frakcją albumin, dostają się do krążenia obwodowego. Dalsza ich aktywność biologiczna w osoczu zależy od ilości „niezasłoniętych” grup funkcyjnych.

ZNACZENIE FLAWONOIDÓW

Różnorodność procesów, na które mogą wpływać flawonoidy w organizmie człowieka, jest ogromna i wynika z liczności tych związków oraz faktu, że działają one na wielu poziomach. Związki te wykazują następujące właściwości biochemiczne:

- działanie antyoksydacyjne,
- zdolność zmiatania wolnych rodników – najsilniejszym zmiataczem w stosunku do rodników tlenu azotu jest pelargonidyna,
- chelatowanie niektórych prooksydacyjnych jonów metali (np. miedź, żelazo), przez co blokują ich zdolność do generowania wolnych rodników,
- wspomaganie działania innych antyoksydantów, np. witaminy C,
- działanie przeciwalergiczne: blokują reakcje alergiczne i hamują wydzielanie histaminy,
- działanie przeciwzapalne: blokują cyklooksygenazy i lipooksygenazy w szlaku kwasu arachidonowego, zmniejszają następstwa stosowania leków przeciwzapalnych – nie powodują owrzodzeń przewodu pokarmowego,
- zwiększanie aktywności enzymów wątrobowych uczestniczących w detoksyfikacji,
- działanie pro- lub antyapoptotyczne (w zależności od zastosowanego związku i stężenia)
- działanie antykancerogenne,
- działanie przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne – bakteriostatyczne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych,
- hamowanie agregacji płytek krwi,
- stabilizacja kolagenu, przez co m.in.: hamują rozwój choroby wieńcowej,
- uszczelnianie i wzmacnianie ściany naczyń krwionośnych (hamując aktywność hialuronidazy), dzięki czemu zapobiegają krwawieniom,

wybroczynom, żylakom, miażdżycy, a jednocześnie chronią przed infekcjami,

- ochrona DNA przed uszkodzeniami spowodowanymi promieniowaniem UV,
- spowalnianie utleniania LDL (utlenione LDL uważane są za mediatora w procesie tworzenia się płytek arteriosklerotycznych),
- wpływ na aktywność wielu enzymów: hamowanie aktywności kinazy białkowej C, reduktazy glutationowej i oksydazy ksantynowej,
- wiązanie z receptorami steroidowymi (jako agoniści lub antagoniści) – stąd mogą wykazywać np. działanie estrogenowe,
- działanie hipoglikemiczne.

Jednakże biologiczna aktywność flawonoidów zależy w dużej mierze od stężenia, w jakim występują: niskie stężenie flawonoli (0,4–1,6 μM) związane jest z ich własnościami antyoksydacyjnymi, podczas gdy wysokie stężenie tych związków (25–100 μM) może zwiększać ich prooksydacyjne działanie.

ZASTOSOWANIE FLAWONOIDÓW

Ze względu na aktywność farmakologiczną flawonoidy są stosowane we współczesnej medycynie. Rutyna i jej półsyntetyczne pochodne zostały wprowadzone jako środki regulujące przepuszczalność naczyń włosowatych i poprawiające krążenie obwodowe. Silimaryna jest jednym z podstawowych związków stosowanych w lecznictwie, jako lek działający ochronnie na komórki miększu wątrobowego. Znane jest działanie hyperozydu i witeksyny na mięsień sercowy oraz dwu- i trójglikozydów kwercetyny na układ moczowy.

Ostatnio dużą nadzieję wiąże się z wprowadzeniem flawonoidów do chemioterapii nowotworów jako tzw. terapii wspomagającej. Genisteina pochodząca z soi ze względu na słabe działanie estrogenowe jest wykorzystywana w zmniejszaniu skutków niedoboru hormonów płciowych u kobiet po menopauzie. Flawonoidy stosuje się także jako naturalne filtry UV oraz środki pielęgnacyjne w kremach przeciwzmarszczkowych oraz przeznaczonych do cery naczynkowej. Są niezbędne dla człowieka w utrzymaniu sprawności i dobrego zdrowia oraz w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób, począwszy od przeziębienia i grypy przez miażdżycę, choroby serca a skończywszy na nowotworach. Paradoksalnie im więcej wiemy o flawonoidach, tym mniej ich spożywamy, zwłaszcza w krajach uprzemysłowionych. Związane jest to z faktem, że w produktach wysoko przetworzonych związki te praktycznie nie występują, podczas gdy największe ich ilości występują w produktach surowych lub naturalnego pochodzenia.

Flawonoidy są także wykorzystywane jako barwniki do żywności (tabela 20).

Tabela 20. Antocyjaniny używane jako naturalne barwniki produktów spożywczych

Symbol	Barwnik spożywczy	Barwa żywności
E163a	Cyjanidyna	Czerwona
E163b	Delfinidyna	Niebieska
E163c	Malwidyna	Fioletowa
E163d	Pelargonidyna	Pomarańczowa
E163e	Peonidyna	Czerwono-brązowa
E163f	Petunidyna	Ciemnoczerwona

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Pomiar zawartości polifenoli w różnych gatunkach herbaty.

Zadanie 1: Oznaczanie całkowitej ilości związków fenolowych za pomocą odczynnika Folina-Ciocalteu w herbatach.

Różne herbaty (czarna, czerwona, zielona) ekspresowe, liściaste i granulowane należy zaparzyć w postaci standardowego 1% roztworu herbaty (1g herbaty na 100 ml wrzątku parzony przez 3 min). Najbardziej popularny gatunek herbaty w Polsce parzyć w różnych odstępach (pobierać próbki natychmiast po zalaniu wrzątkiem, 1 min po zalaniu, po 3, 5 i 10 min zaparzania). Rozcieńczyć próbki 5-krotnie zimną wodą destylowaną. 100 µl tak przygotowanych roztworów zmieszać z 750 µl odczynnika Folina-Ciocalteu (rozcieńczony 10-krotnie wodą destylowaną) i pozostawić przez 5 min w temperaturze pokojowej. Dodać 750 µl roztworu wodorowęglanu sodu (60 g/l). Przygotować serię roztworów kwercetyny w etanolu o stężeniach: 5 mM, 2,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, która posłuży do kalibracji. Jako próbki ślepej należy użyć czystego rozpuszczalnika. Do każdej próbki 100 µl kwercetyny dodać odczynnik Folina-Ciocalteu i wodorowęglanu sodu, postępując dokładnie tak jak w przypadku badanych próbek.

Mieszankiny reakcyjne inkubować przez 90 min w ciemności. Po tym czasie zmierzyć absorbancję próbek w świetle o fali długości 725 nm. Porównać całkowitą zawartość polifenoli w przygotowanych roztworach w zależności od źródła i czasu zaparzania.

Zadanie 2: Oznacz stężenie flawonoidów metodą absorbcjometryczną

Przygotuj serię rozcieńczeń kwercetyny lub katechiny (w zakresie 0–300 µg/ml) w celu sporządzenia krzywej wzorcowej. Do 1 ml naparów herbacianych oraz próbek wzorcowych dodaj 0,2 ml roztworu chlorku glinu (20 g/dm³) i uzupełnij 1,3 ml mieszaniny kwasu octowego z metanolem (1:19). Próbkę ślepą stanowi 1 ml próbki z 1,5 ml mieszaniny kwasu octowego z metanolem (1:19).

Zmierz absorbancję przy fali długości 425 nm. Z wartości absorbancji próbek wzorcowych wykreśl krzywą standardową, z której odczytasz stężenie flawonoidów w badanych próbkach na podstawie wyników pomiarów absorbancji.

Zadanie 3: Test wanilinowy na zawartość procyanidyn.

Odważ 0,1 g każdego badanego gatunku herbaty i zalej 10 ml metanolu. Inkubuj przez 15 min. Zwiruj próbki 5 min przy 11 000 × rcf. Przygotuj serię rozcieńczeń katechiny w metanolu o zakresie stężeń 0–300 µg/ml.

W dwóch seriach próbek umieść po 1 ml ekstraktów herbacianych lub wzorcowych próbek katechiny. Do jednej serii próbek dodaj po 2,5 ml metanolu (próba zerowa Z), do drugiej serii po 2,5 µl roztworu 1% waniliny w metanolu (próbka W). Do wszystkich próbek dodaj po 2,5 ml 9M HCl w metanolu i zmieszaj. Wykonaj próbki ślepe odczynnikowe: próba odczynnikowa X składa się z 3,5 ml metanolu i 2,5 ml 9M HCl w metanolu, próba odczynnikowa Y składa się z 1 ml metanolu, 2,5 ml 1% waniliny w metanolu i 2,5 ml 9M HCl w metanolu. Inkubuj wszystkie próbki przez 20 min w temperaturze 30°C. Zmierz absorbancję przy świetle o fali długości 500 nm. Absorbancja pochodząca od cyjanidyn będzie wyrażała się wzorem: $A = (W - X) - (Y - Z)$.

Narysuj wykres zależności absorbancji próbek katechiny od jej stężenia. Z tak przygotowanej krzywej standardowej odczytaj wartości stężeń procyanidyn odpowiadające absorbancjom próbek herbaty.

Porównaj proporcje między wynikami uzyskanymi dla zielonej i czarnej herbaty dla pomiarów zawartości polifenoli, flawonoidów i procyanidyn. O czym świadczą obserwowane różnice? Znajdź informacje dotyczące rodzaju polifenoli obecnych w herbacie czarnej i zielonej.

Zadanie 4: Przeprowadź oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych flawonoidów oraz naparów herbacianych metodą FRAP według protokołu znajdującego się w rozdziale 11.

Pomiar FRAP wykorzystywany jest do określenia całkowitego potencjału antyoksydacyjnego wielu związków chemicznych, płynów ustrojowych.

wych i tkanek. Metoda ta polega na redukcji jonów żelazowych (Fe III) do żelazawych (Fe II) w niskim pH (300 mM bufor octanowy pH=3,6). Powstały kompleks posiada intensywnie niebieską barwę z maksimum absorpcji przy fali długości 593 nm. Intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do stężenia jonów żelaza II, co wyraża poziom potencjału antyoksydacyjnego.

Uzyskane wyniki wykorzystaj w analizie korelacji wartości FRAP z zawartością polifenoli, flawonoidów i procyanidyn w próbkach herbaty.

Zadanie 5: Za pomocą internetowych baz danych lub biblioteki wirtualnej wyszukaj publikacje na temat wpływu herbaty (czarnej, zielonej, czerwonej) na zdrowie. Przedyskutuj zebrane dane w grupie i wyciągnij wnioski.

Zadanie 6: Oblicz swoje średnie dzienne spożycie flawonoidów na podstawie zebranych danych żywieniowych z całego tygodnia (bieżące notowania), podczas wykonywania ćwiczeń z rozdziału 5, korzystając z bazy danych znajdującej się na stronie internetowej Food and Nutrition Information Center: <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition/individual-macronutrients-phytonutrients-vitamins-minerals/phytonutrients>

Przeprowadź analizę zależności pomiędzy oznaczoną wartością FRAP w ślinie (rozdział 11) a średnim dziennym spożyciem flawonoidów, korzystając z wyników osób biorących udział w ćwiczeniach.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Kapiszewska M., *et al*, *High Tea Consumption Diminishes Salivary 17 Beta-Estradiol Concentration in Polish Women*, "British Journal of Nutrition" vol. 95, 2006, nr 5, s. 989–995.

Malińska D., Kiersztan A., *Flawonoidy – charakterystyka i znaczenie w terapii*, „Postępy Biochemii” t. 50, 2004, nr 2, s. 182–196.

Trzeciak A., *Kwercetyna: znaczenie w mutagenezie i karcynogenezie*, „Postępy Biochemii” t. 47, 2001, nr 4, s. 299–305.

Olas B., *Antyoksydanty obecne w diecie w walce z miażdżycą*, „Kosmos”, t. 52, 2003, nr 2–3, s. 249–258.

Olas B., *Resweratrol jako dobroczynca w profilaktyce chorób układu krążenia*, „Kosmos” t. 55, 2006, nr 2–3, s. 277–285.

Kapiszewska M. *et al*, *The Protective Ability of Mediterranean Plant Extracts against the Oxidative DNA Damage. The Role of the Radical Oxygen Species and the Polyphenol Content*, "Journal of Physiology and Pharmacology" t. 56, 2005, supl. 1, s. 183–197.

Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y., *Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extracts, Health Foods and Grape Seed Oils*, "Journal of Health Sciences", vol. 49, 2003, nr 1, s. 45–54.

Kosmala M., Kołodziejczyk K., *Procyjanidyny najpopularniejszych w Polsce deserowych odmian jabłek*, „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość”, 2006, nr 2 (47), supl., s. 124–134.

Farmakopea Polska V, t. I, PZWL, Warszawa 1990.

13. Stan wysycenia organizmu witaminą C

WSTĘP

Witamina C, czyli askorbinian, jest związkiem o silnym działaniu przeciwutleniającym dobrze rozpuszczalnym w rozpuszczalnikach polarnych. Układ kwas askorbinowy / kwas dehydroaskorbinowy uczestniczy w regulowaniu potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w komórkach i płynach ustrojowych. Odpowiada również za regenerację witaminy E. Witamina C jest konieczna do produkcji kolagenu (redukuje atom miedzi w centrum aktywnym hydroksylazy kolagenowej). Bierze udział w metabolizmie tłuszczów, cholesterolu i kwasów żółciowych, a także uczestniczy w syntezie sterydowych hormonów nadnerczy oraz metabolizmie tyrozyny. Jest czynnikiem stabilizującym układ odpornościowy oraz wspomaga wchłanianie żelaza niehemowego i manganu z jelit do krwiobiegu.

Dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym witamina C zmniejsza ryzyko występowania licznych chorób, takich jak: choroby serca, zaćma, miażdżyca, zwyrodnienia układu kostno-stawowego oraz nowotwory (przełyku, żołądka, wątroby, płuc, szyjki macicy, odbytu).

Witamina C jest syntetyzowana w organizmach większości gatunków zwierząt, a tylko człowiek, małpy człekokształtne i świnki morskie muszą dostarczać ją z pokarmem. U człowieka gen kodujący enzym przekształcający lakton kwasu L-gulonowego w kwas askorbinowy jest nieaktywny, dlatego konieczne jest dostarczanie z dietą codziennie minimum 70 mg kwasu askorbinowego. Kwas askorbinowy nie jest magazynowany w organizmie człowieka, a spożyty nadmiar jest wydalany z organizmu wraz z moczem. Silne niedobory witaminy C występują rzadko i najczęściej ma to miejsce u alkoholików, osób palących tytoń, ludzi starszych i źle odżywianych. Hipowitaminoza askorbinianu po-

woduje wzrost pękania naczyń krwionośnych, osłabienie organizmu, obrzęk i krwawienie dziąseł i zwiększoną łamliwość kości. Do objawów niedoboru witaminy C należą także zaburzenia w tworzeniu kolagenu, co skutkuje wolniejszym gojeniem się ran oraz osłabieniem naczyń włosowatych i wzrostem ryzyka powstawania mikrowylewów. Wszystko to prowadzi do zwiększenia podatności na infekcje bakteryjne. Przy hipowitaminozie askorbinianu występują także zaburzenia w przemianach kwasów tłuszczowych, bóle mięśniowe, zmęczenie, apatia oraz brak apetytu. W przypadkach chronicznej awitaminozy organizmowi grozi szkorbut, czyli gnilec.

Zapotrzebowanie człowieka na witaminę C jest bardzo duże, bo około dwa rzędy wielkości większe niż zapotrzebowanie na inne witaminy, wynosi średnio 70–100 mg. W czasie stresu, choroby lub wysiłku fizycznego zapotrzebowanie na witaminę C wzrasta.

Do głównych źródeł witaminy C należą owoce i warzywa (tabela 21). Wiele produktów żywnościowych jest wzbogaconych w witaminę C ze względu na duże straty podczas obróbki termicznej w procesach kulinarnych i technologicznych. Kwas askorbinowy pełni również rolę przeciwutleniającego środka konserwującego.

Tabela 21. Średnia zawartość witaminy C w owocach i warzywach [mg/100 g]

Produkt [100g]	Ilość witaminy C [mg]
Dzika róża	1700
Czarna porzeczka	183
Papryka czerwona	144
Brukselka surowa	94
Papryka zielona	91
Kalafior	69
Szpinak	68
Truskawki	68
Kalarepa	65
Poziomki	60
Kiwi	59
Kapusta czerwona	54
Brokuły	52
Cytryny	50
Pomarańcze	49
Pomidory	23
Kapusta kwaszona	16
Ziemniaki wczesne	16

Ziemniaki późne	11
Jabłka	9
Ogórki	8
Cebula	6
Gruszki	5
Śliwki	5
Fasola	2

Źródło: opracowane na podstawie Kunachtowicz *et al.* 2005 oraz NSDA.

Witamina C nie jest toksyczna, w związku z tym nawet duże dawki nie wywołują skutków ubocznych. Jednakże chroniczne spożywanie jej w dawkach powyżej 1 g powoduje zakwaszenie moczu, co upośledza wydalanie zarówno związków kwasowych i zasadowych. Ponadto kwaśny odczyn moczu może powodować wytrącanie się moczanów i cytrynianów, sprzyjając tworzeniu się kamieni nerkowych. Czasami hiperwitaminoza objawia się wysypką skórą, nudnościami, biegunką.

OZNACZANIE WITAMINY C

Oznaczenie witaminy C w roztworze przeprowadza się przez miareczkowanie barwnikiem Tillmansa do momentu pojawienia się jasno różowego zabarwienia. Metoda Tillmansa oparta jest na redukcji 2,6-dichlorofenolindofenolu (2,6-DPIP) przez kwas L-askorbinowy.

Metoda ta ma zastosowanie tylko dla roztworów bezbarwnych i nie zawierających innych związków, które powodują redukcję odczynnika Tillmansa. W przypadku roztworów silnie zabarwionych stosuje się modyfikację polegającą na miareczkowaniu w rozpuszczalniku organicznym (chloroform, ksylen).

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Porównanie stanu wysycenia organizmu witaminą C u osób spożywających dodatkową porcję świeżych owoców przez tydzień z osobami z grupy kontrolnej.

Zadanie 1: Pobranie próbek. Połowa grupy przez tydzień do swojej diety włącza 3 jabłka dziennie (lub pół kg innych owoców bogatych w witaminę C, ale wszyscy takie same), podczas gdy druga połowa grupy nie zmienia swojego sposobu żywienia. W dniu zajęć należy rano na

czczo pobrać próbkę moczu. W czasie zajęć pobierz próbkę śliny: za pomocą 10 ml wody destylowanej płucz usta przez 30 s. Zbierz 10 ml płynu do jałowej probówki. Pamiętaj, żeby na dwie godziny przez zajęciami niczego nie jeść ani nie pić (woda jest dopuszczalna).

Zadanie 2: Dokonaj pomiaru zawartości witaminy C w ślinie za pomocą metody Tillmansa.

WYKONANIE

W kolbie stożkowej o pojemności 25 ml umieść 10 ml moczu lub zawiesiny śliny i miareczkuj mianowanym odczynnikiem Tillmansa do otrzymania lekko różowej barwy utrzymującej się około 10 s.

Masa molowa kwasu askorbinowego wynosi 176 g/mol. Z równania reakcji kwasu askorbinowego z 2,6-DPIP wynika, że 1 mol roboczego roztworu tego barwnika reaguje z 1 molem kwasu. Korzystając z tej zależności oraz znając stężenie roztworu barwnika, oblicz ilość witaminy C w badanej próbce. Jeżeli stężenie odczynnika nie zostało mianowane, wykonaj oznaczenie zawartości witaminy C dla serii rozcieńczeń komercyjnego preparatu kwasu askorbinowego o zadeklarowanym stężeniu, jako próbek standardowych.

Porównaj wyniki pochodzące od różnych osób z grupy kontrolnej oraz od osób spożywających dodatkowe owoce. Sformułuj wnioski płynące z porównania zawartości witaminy C w moczu i ślinie tych samych osób.

Zadanie 3: W bibliotece wirtualnej lub internetowych bazach danych znajdź publikacje na temat wpływu witaminy C na zdrowie. Połowa grupy przygotowuje się do obrony stanowiska L. Paulinga, że spożywanie witaminy C w bardzo dużych ilościach (rząd wielkości kilku gramów dziennie) jest korzystne dla zdrowia człowieka; druga połowa grupy gromadzi argumenty przeciwne.

Zadanie 4: Zmierz stężenie witaminy C w preparatach farmaceutycznych, komercyjnych sokach, naparach ziołowo-owocowych. Sprawdź, czy uzyskane wartości pokrywają się z danymi podanymi przez producenta.

14. Polimorfizm genetyczny a ryzyko zachorowań na różne choroby. Zagadnienia bioetyczne

WSTĘP

Zmienność w sekwencji DNA w obrębie tych samych genów u różnych osób jest jednym z czynników wpływających na różnorodność osobniczych odpowiedzi na czynniki chorobowe, patogeny, chemikalia, leki, składniki diety itp. Gdy ten sam gen występuje w różnych formach (allelach), zjawisko to nosi nazwę polimorfizmu genetycznego. Każdy człowiek charakteryzuje się unikalną kompozycją genów polimorficznych. Częstotliwość występowania polimorficznych alleli różni się pomiędzy populacjami, a także lokalizacjami geograficznymi populacji.

Konsekwencją tego zróżnicowania jest np. rozwój badań nad osobniczym doбором leków dla pacjentów różniących się zdolnością absorbowania oraz metabolizowania poszczególnych substancji farmakologicznych. Pojawiła się także nowa dziedzina badań zwana genomiką żywienia (nutrigenomiką).

Jeżeli zmiany polimorficzne genów przekładają się na zmianę aktywności enzymów przez nie kodowanych, to rezultatem może być odmienna zdolność metabolizowania np. związków kancerogennych. Jeżeli zmiany polimorficzne genów przekładają się na zmianę aktywności enzymów przez nie kodowanych, to rezultatem może być odmienna zdolność metabolizowania np. związków kancerogennych, toksyn, leków, związków fitochemicznych itp.

W przypadku genów kodujących enzymy I i II fazy detoksykacji odpowiedzialnych za metabolizm, m.in. takich czynników kancerogennych jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i aminy heterocykliczne, częstotliwość występowania alternatywnych alleli może dotyczyć nawet połowy populacji, ale wzrost ryzyka zachorowania osób po-

siadających taki allel w stosunku do reszty osobników jest nieznaczny (np. 1,5–3-krotnie). Oznacza to, że w procesie chorobowym zachodzi interakcja kilku genów i wielu czynników środowiskowych. Choroby takie nazywamy wieloczynnikowymi. Choroby, za które odpowiedzialna jest jedna mutacja w jednym genie, występują bardzo rzadko.

Wzrost ryzyka wystąpienia wielu schorzeń jest wynikiem złożonych interakcji pomiędzy zróżnicowaną aktywnością enzymów wynikającą z polimorfizmu kodujących je genów a czynnikami środowiskowymi oraz zróżnicowaniem stylu życia. Zwykle trudno oszacować wkład każdego z tych czynników oddzielnie na rozwój procesu chorobowego. W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania epidemiologiczne i genetyczne zmierzające do ustalenia korelacji pomiędzy polimorfizmami genetycznymi, czynnikami środowiska a występowaniem ryzyka różnych chorób, ze szczególnym naciskiem na nowotwory.

W ciągu całego życia organizm narażony jest na działanie wielu szkodliwych czynników, często skutecznie usuwanych, co jest następstwem istnienia wydajnych mechanizmów obronnych oraz naprawczych. Jednak o skuteczności działania tych mechanizmów decydują między innymi czynniki genetyczne. Ponieważ nie mamy możliwości zmiany swojego genotypu, wydaje się, iż jedyną rozsądną strategią w celu zachowania zdrowia jest unikanie ekspozycji na szkodliwe czynniki oraz stymulowanie procesów naprawczych.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Genom – całość informacji genetycznej komórki (i organizmu); obejmuje geny oraz niekodujące sekwencje DNA.

Gen – fragment DNA stanowiący jednostkę informacji genetycznej. Stanowi matrycę kodującą sekwencję aminokwasową określonego białka (odczytywanego za pośrednictwem mRNA). Może też określać sekwencję różnych funkcjonalnych RNA (tRNA, rRNA), które nie służą, jako informacja do syntezy białek. Dawniej genom nazywano jednostką dziedziczenia, warunkującą powstawanie i przekazywanie potomstwu jakiegś cechy np.: kolor oczu, kolor kwiatu.

Allel – jedna z wersji genu w określonym miejscu (locus) na danym chromosomie homologicznym (u człowieka występuje 46 chromosomów: 22 pary homologicznych chromosomów autosomalnych i 2 chromosomy płciowe). Allele tego samego genu różnią się jednym lub więcej nukleotydami, a czasem całymi fragmentami sekwencji. Mogą powodować różnice w sekwencji aminokwasów kodowanego białka lub odmiennymi właściwościami mRNA i fenotypowo skutkować odmiennym

wykształceniem cechy (brązowy i niebieski kolor oczu) lub zmianą poziomu ekspresji danego genu. Do komórek rozrodczych (gamet) allele rozdzielane są pojedynczo. Chociaż w populacji może występować wiele alleli tego samego genu, dana osoba może posiadać najwyżej dwa.

Polimorfizm – genetyczne różnicowanie oznaczające, iż ten sam gen występuje w populacji różnych formach (allelach). Zmianę polimorficzną odróżnia się od mutacji częstością jej występowania. Jeżeli w populacji zmiana sekwencji nukleotydów występuje częściej niż w 1%, to przyjmuje się ją jako zmianę polimorficzną. Polimorfizm może odnosić się do pojedynczego nukleotydu (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), bądź też do dłuższej sekwencji.

SNP mogą występować w określonych loci w obrębie sekwencji kodujących zarówno jak i niekodujących. Polimorfizmy w regionach kodujących genów niekoniecznie zmieniają sekwencję aminokwasów w powstającym na bazie tego genu białku, dzięki zjawisku zdegenerowania kodu genetycznego. SNP nie zmieniające translacji DNA mogą jednak prowadzić do modyfikacji wiązania się czynników transkrypcyjnych, modyfikacji na etapie splicingu, dojrzewania mRNA lub mogą zmieniać jego trwałość.

Zadanie 1: Dyskusja na temat aspektów etycznych celowości badań genetycznych. Przeanalizuj etyczne aspekty wykonywania indywidualnych profili genetycznych pracownikom mających wykonywać pracę w warunkach szkodliwych dla zdrowia. Przemysł następujące zagadnienia:

Czy jest dopuszczalne, aby badanie genetyczne było elementem procesu rekrutacyjnego u pracodawcy, co ma prowadzić do obniżenia częstotliwości występowania chorób zawodowych pośród pracowników?

Czy należy informować osoby odrzucone w procesie rekrutacji o ich genotypie?

Czy takie osoby powinny się starać o odszkodowanie z powodu dyskryminacji, czy raczej czuć wdzięczność za niezwiększanie ryzyka wystąpienia u nich choroby?

Czy diagnostyka genetyczna to działanie skierowane na ochronę jednostki, czy może drastyczne ograniczenie jej wolności?

Czy uważasz, że lepiej mieć wolny wybór oparty na znajomości swoich genetycznych predyspozycji, czy może lepiej narażać się nieświadomie?

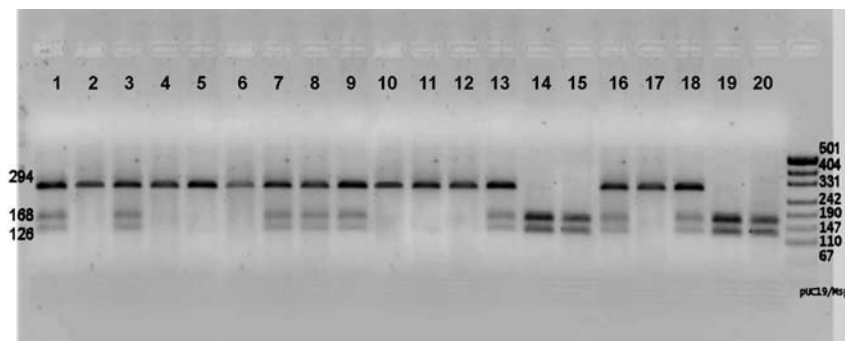
Kto powinien mieć dostęp do profilu genetycznego poszczególnych osób? Lekarze, farmaceuci, dietetycy, pracodawcy, firmy ubezpieczeniowe?

Czy indywidualne projektowanie diety na podstawie profili genetycznych może mieć podobne znaczenie jak dobór terapii na tych samych zasadach?

Zadanie 4: Na podstawie zdjęcia żelu elektroforetycznego (Rycina 17) zidentyfikuj osoby będące homozygotami dzikiego typu (CC), homozygotami allelu alternatywnego (TT) i heterozygotami genu MTHFR (CT). Wpisz dane do zamieszczonej poniżej tabeli. Zanalizuj wpływ posiadanego polimorfizmu na stężenie folianów we krwi (tabela 22). Jak zależność tę modyfikuje suplementacja diety 400 µg kwasu foliowego codziennie przez cztery tygodnie?

Uzyskane informacje wykorzystasz następnie podczas zajęć dotyczących stabilności genetycznej komórek (rozdział 15).

Rycina 17. Zdjęcie żelu elektroforetycznego z analizy polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych odcinka genu MTHFR (reduktaza metylenotetrahydrofolianowa). W pozycji 677 genu MTHFR (ekson 4) zamiana cytozyny na tyminę powoduje zmianę alaniny na walinę w domenie katalitycznej, co skutkuje termolabilnością oraz spadkiem aktywności enzymu. Enzym restrykcyjny *HinfI* rozpoznaje sekwencję palindromową G↓ANTC. Powielony fragment genu MTHFR o długości 294 pz jest trawiony przez *HinfI*, tylko w przypadku zmutowanego allelu (T) do fragmentów o długości 168 i 126 pz, natomiast allel dzikiego typu (C) nie jest trawiony. U heterozygot (CT) obecne są wszystkie 3 prążki (294, 168 i 126 pz)



Źródło: zdjęcie z badań własnych M. Kalemby-Drożdż.

Tabela 22. Stężenie folianów we krwi przed i po suplementacji diety kwasem foliowym (400µg/dzień/4 tygodnie) u 20 młodych zdrowych kobiet

Osoba	MTHFR	Stężenie folianów we krwi przed suplementacją	Stężenie folianów we krwi po suplementacji
1		12,82	17,49
2		11,03	18,51
3		11,89	15,73
4		15,00	19,54
5		12,10	19,30
6		15,78	22,00
7		14,12	17,71
8		12,26	20,74
9		11,00	18,01
10		15,40	21,80
11		13,20	17,29
12		10,62	19,57
13		9,20	13,40
14		7,78	21,70
15		9,99	12,00
16		6,40	13,08
17		11,14	16,62
18		11,20	20,03
19		7,00	22,12
20		3,60	13,68

Źródło: dane pochodzą z eksperymentów własnych prowadzonych w Zakładzie Biochemii Ogólnej Wydziału Biotechnologii UJ.

Zadanie 5: Korzystając z żywieniowej bazy danych zawierającej ilość folianów w produktach spożywczych znajdującej się na stronie Food and Nutrition Information Center: <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition/individual-macronutrients-phytonutrients-vitamins-minerals/vitamins-minerals>) oraz z bazy FAO zawierającej informacje o wielkości spożycia produktów spożywczych w różnych krajach, a także z bazy danych GLOBOCAN zawierającej dane na temat śmiertelności i zachorowalności na choroby nowotworowe, sprawdź, czy istnieje zależność pomiędzy poziomem spożycia folianów a ryzykiem nowotworów, w szczególności białaczek. Informacje o adresach internetowych baz danych znajdują się w rozdziale 10.

Zadanie 6: Skorzystaj z danych na temat częstości występowania polimorfizmów w genie MTHFR w eksonie 4 C677T i eksonie 7 A1298C w kilku krajach (tabela 23) lub zbierz podobne informacje, korzystając z dostępnych danych literaturowych (np. medycznych baz publikacji). Dane uzupełnij o poziom spożycia folianów w tych krajach (internetowe bazy danych) oraz częstość występowania tam wybranych nowotworów. Sprawdź, czy istnieje między tymi danymi zależność, pamiętając, że są to zależności jedynie szacunkowe. Korzystając z protokołu laboratoryjnego zamieszczonego w załączniku 6 (protokół RFLP MTHR), wykonaj oznaczenie dla grupy studentów i odnieś wyniki do częstotliwości występowania tych polimorfizmów w populacji europejskiej.

Tabela 23. Częstość występowania polimorfizmów genu MTHFR w pozycji 677 i 1298 w różnych populacjach

Badana populacja	% częstość genotypów MTHFR					
	ekson 4 pozycja 677			ekson 7 pozycja 1298		
	CC	CT	TT	AA	AC	CC
Japonia	44	42	14			
Anglia	53	33	14			
Brazylia	64	32	4			
Hiszpania	33	48	19			
Arabia Saudyjska	71	22,6	6,4	55	42	3
Afroamerykanie	81	27	0	69	27	4
Ameryka (typ kaukaski)	49	44	9	36	48	16
Chiny	33	51	16	69	27	4
Egipt	50	43	7	46	45	9
Macedonia	42	45	13	49	47	4
Polska	57	34	8	45	45	10

Źródło: opracowanie M. Kalembska-Drożdż.

Zadanie 7: Osiągnięcia genetyki, biochemii, biologii molekularnej, farmakogenomiki, medycyny molekularnej, bioinformatyki oraz dietetyki stanęły u podstaw nowych dziedzin nauki. Nutrigenomika i nutrigenetyka wyjaśniają zależności między genomem a składnikami odżywczymi. Oddziaływanie dieta – geny działa w dwie strony. Geny determinują tempo metabolizmu i zdolność do wykorzystywania i zagospodarowania składników odżywczych. Z drugiej strony składniki żywności mogą modyfikować ekspresję genów.

Nutrigenomika zajmuje się badaniem wpływu składników żywności na ekspresję genów przez co można modulować ryzyko wystąpienia chorób. Nutrigenetyka zaś zajmuje się badaniem jak różnice genetyczne

pomiędzy osobami i populacjami modyfikują zdolności metabolizowania lub odpowiedzi na składniki odżywcze oraz jak wpływają na ryzyko różnych schorzeń, w tym chorób dietozależnych. Jednym z celów tych dziedzin nauki jest opracowywanie indywidualnej diety dopasowanej do profilu genetycznego a dążącej do minimalizacji ryzyka chorób.

Znajdź częstotliwość występowania alleli polimorficznych w populacji europejskiej genów kodujących:

S-transferazy glutationowie: GSTM1, GSTT1, GSTP1

Dysmutazy ponadtlenkowe: SOD2, SOD3

Mediatorzy stanów zapalnych: TNF alfa, IL-6, NOS3

Receptor witaminy D

Białka zaangażowane w metabolizm lipidów: CETP, LPL, APOC3, APOE, ACE

Spróbuj określić specjalne zalecenia żywieniowe dla osób posiadających alternatywne allele tych genów. Oceń, na ile te specjalne zalecenia odbiegają od diety zalecanej dla większości populacji opisanej w rozdziale 6?

Zaproponuj składniki pokarmowe, które mogą zmienić ekspresję genów I i II fazy detoksyfikacji, by usprawnić procesy odtruwania organizmu ze związków kancerogennych.

Zadanie 8: Przeczytaj artykuł pt.: *Polimorfizm genów odpowiedzialnych za metabolizm estradiolu a ryzyko nowotworów hormonozależnych z załącznika 5D*. Korzystając z biblioteki wirtualnej lub internetowych baz danych (np. PubMed) spróbuj zidentyfikować pokarmy, które mogą zmodyfikować ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za syntezę, transport oraz katabolizm estrogenów, a tym samym mogą potencjalnie modulować stężenie estrogenów w organizmie.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Kalemba-Drożdż M., *Niedobory folianów w diecie i ich wpływ na stabilność genetyczną*, [w:] *Interdyscyplinarne aspekty nauk o zdrowiu*, red. G. Dębska, J. Jaśkiewicz, Kraków 2011, s. 21–32.

Kapiszewska M. et al., *The COMT – Mediated Metabolism of Flavonoids and Estrogen and Its Relevance to Cancer Risk*, "Polish Journal of Food and Nutrition", vol. 12/53, 2003, s. 141–146.

Kapiszewska M., et al., *Uracil Misincorporation into DNA of Leukocytes of Young Women with Positive Folate Balance Depends on the Plasma Vitamin B₁₂ Concentrations and Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms*, "The Journal of Nutrition Biochemistry" vol. 16, 2005, nr 8, s. 467–478.

15. Wpływ wybranych czynników dietetycznych na stabilność genetyczną. Metody pomiaru uszkodzeń DNA

WSTĘP

Materiał genetyczny podlega ciągłemu działaniu szkodliwych czynników chemicznych i fizycznych pochodzących ze środowiska oraz z metabolizmu komórkowego. Codziennie w każdej ludzkiej komórce generowanych jest ok. 10 000–15 000 uszkodzeń DNA.

Ilość wolnych rodników reaktywnych form tlenu, najczęściej odpowiedzialnych za uszkodzanie DNA, w komórce zależy od poziomu ich tworzenia oraz od efektywności systemów antyoksydacyjnych. Oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych należą do najczęściej występujących uszkodzeń DNA. W każdej komórce obecna jest zawsze pewna ich ilość. To wynik istnienia dynamicznej równowagi pomiędzy powstawaniem uszkodzeń DNA a usuwaniem zmodyfikowanych zasad przez enzymy naprawcze. Często stanowią one swoisty marker postępujących procesów zapalnych i toczącej się choroby.

Istnieje liniowa zależność pomiędzy poziomem zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA a wiekiem, w komórkach osób starszych obserwuje się wyraźną akumulację uszkodzeń oksydacyjnych. Ilość modyfikacji oksydacyjnych zasad azotowych jest niższa u kobiet niż u mężczyzn.

WPŁYW SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH NA POZIOM USZKODZEŃ DNA

Pokarm, jako jeden z czynników środowiskowych, może modułować procesy generowania i usuwania aktywnych form tlenu. Wydajność wielu systemów ochronnych zależy od ilości spożywanych składników odżywczych. Przy deficytach antyoksydantów pochodzących z diety może nasilać się stres oksydacyjny i rośnie liczba uszkodzeń struktur komórkowych, łącznie z materiałem genetycznym, które to uszkodzenia prowadzą do najpoważniejszych skutków zdrowotnych. Istnieje wiele epidemiologicznych danych pokazujących ogromny wpływ diety na stabilność genetyczną komórek. Stwierdzono, że niedobory niektórych składników, jak: witamina C, witamina A, witamina E, cynk i żelazo, prowadzą do zwiększenia liczby oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Podobnie niezrealizowanie dziennego zapotrzebowania na kwas foliowy, witaminę B₁₂ i B₆ prowadzi do zmniejszenia stabilności genetycznej przez wzrost poziomu błędnie wbudowanego uracylu, zmianę stopnia metylacji i pęknięcia chromosomów. Zmiany w materiale genetycznym wynikające z niedoborów dietetycznych są analogiczne do uszkodzeń spowodowanych promieniowaniem elektromagnetycznym, czyli prowadzą do pojedynczo- i podwójnoniciowych pęknięć DNA oraz modyfikacji oksydacyjnych zasad azotowych.

Warzywa i owoce są bogatym źródłem witamin, mikroelementów oraz naturalnych flawonoidów o działaniu antyoksydacyjnym. Jak pokazują badania epidemiologiczne, występuje silna korelacja pomiędzy niskim spożyciem warzyw i owoców a zachorowalnością na nowotwory i wiele innych chorób. Dużo składników odżywczych bezpośrednio pełni rolę przeciwutleniaczy w komórce, na przykład: witaminy C i E, karotenoidy oraz roślinne polifenole (w tym flawonoidy). Wykazano istnienie niewątpliwie pozytywnej korelacji pomiędzy poziomem witaminy C a zmniejszeniem ryzyka zachorowalności na raka żołądka, płuc, arteriosklerozę i choroby wieńcowe, czyli schorzeń, z którymi związany jest silny stres oksydacyjny. Więcej o witaminie C znajdziesz w rozdziale 13.

Witamina E jest głównym przeciwutleniaczem rozpuszczalnym w tłuszczach. Tokoferole (α i γ) zmiatają przede wszystkim reaktywne formy tlenowo-azotowe chroniąc lipidy, DNA i białka. Niedobory witaminy E prowadzą do osłabienia odporności, stanów zapalnych, zwiększając ryzyko nowotworów odbytu i prostaty oraz chorób serca. Witamina E jest regenerowana przez witaminę C, ważne jest zatem zapewnienie odpowiednio wysokiego poziomu spożycia obydwu tych związków.

Naturalne flawonoidy pochodzące z pokarmów roślinnych wykazują działanie przeciwutleniające. Bogatymi źródłami flawonoidów są: wino,

herbata, owoce, warzywa i różnorodne nasiona. Przypuszcza się, że flawonoidy razem z witaminami antyoksydacyjnymi są odpowiedzialne za prewencyjny wpływ owoców i warzyw na zapadalność na choroby degeneracyjne. Flawonoidy przechodzą te same detoksykujące szlaki metaboliczne co estrogeny i hydrofobowe ksenobiotyki. Wszystkie te substancje współzawodniczą o te same metabolizujące je enzymy i mogą wzajemnie modulować swoje działanie na komórki i organizm. Więcej informacji o flawonoidach znajdziesz w rozdziale 12.

Ponadto składniki dietetyczne są koenzymami w licznych procesach redukcyjno-oksydacyjnych, jak np. ryboflawina (witamina B₂) czy nikotynamid (witamina PP).

Oprócz przeciwutleniaczy drobnocząsteczkowych i przENOŚNIKÓW ŁADUNKÓW również komórkowe systemy antyoksydacyjne i naprawcze zależą od składników odżywczych. Na przykład jony niektórych metali, mikroelementów dostarczanych z pokarmem, znajdują się w centrach aktywnych enzymów odpowiedzialnych za inaktywację reaktywnych form tlenu. Jony żelaza znajdują się w centrach aktywnych wielu białek uczestniczących w cyklach redukcyjno-oksydacyjnych, np. cytochromów należących do enzymów I fazy detoksyfikacji. Zarówno niedobór, jak i nadmiar żelaza prowadzi do podniesienia poziomu uszkodzeń oksydacyjnych DNA, ponieważ i przy niskim, podobnie jak przy zbyt wysokim, poziomie jonów żelaza dochodzi do zachwiania równowagi oksydacyjno-redukcyjnej.

Cynk jest komponentem ponad 300 białek komórkowych, w tym ponad 100, które wiążą się do DNA i oddziałują z nim za pomocą struktury palców cynkowych. Zmiana funkcjonalności białka p53, którego zmutowana forma pojawia się w około połowy przypadków ludzkich nowotworów, wiąże się z utratą w jego strukturze jonów cynku. Cynk stabilizuje strukturę m.in. czynników transkrypcyjnych oraz receptorów steroidowych. Niedobory tego mikroelementu w diecie wiążą się ze wzrostem liczby pęknięć chromosomów przez wzrost poziomu utlenionych zasad azotowych. Może to być skutkiem utraty aktywności cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej (Zn/CuSOD) lub inaktywacji białek naprawczych zawierających jony cynkowe, np. białko Fpg, endonukleazy III i IV.

Miedź jest również składnikiem Zn/CuSOD i jej niedobory wyraźnie zaburzają aktywność tego enzymu. Ponadto występuje w ceruloplazminie, która uczestniczy w załadunku żelaza na transferynę.

Natomiast mangan jest obecny w centrum aktywnym mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej. Jego deficyt może prowadzić do wzrostu poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w mtDNA.

Podsumowując, niedobory składników odżywczych mogą prowadzić do zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w komórkach i wywołania stanu stresu oksydacyjnego, upośledzenia funkcji naprawczych, a w konsekwencji do podniesienia poziomu uszkodzeń DNA i utraty stabilności genetycznej.

POKARMY O UDOKUMENTOWANYM DZIAŁANIU PRZECIWNOWOTWOROWYM

Na tej liście znalazły się przede wszystkim warzywa i owoce:

brokuły, brukselka, kalafior, kapusta biała, papryka, rzodkiewka, awokado, szparagi, borówki, marchew, cebula, pomarańcze, szpinak, pomidory, winogrona, orzechy, herbata, siemię lniane;

oraz zioła i przyprawy bogate we flawonoidy:

rozmaryn, szałwia, tymianek, lebiodka (oregano), imbir, goździki, kurkuma, bazylia, kminek, czosnek, jarmuż, majeranek, liść laurowy, mięta pieprzowa.

WPŁYW WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH I AMIN HETEROCYKLICZNYCH NA STABILNOŚĆ GENETYCZNĄ

Wśród składników pokarmu mogą występować substancje mutagenne lub kancerogenne. Niektóre z nich powstają podczas obróbki termicznej ryb i mięsa, szczególnie gdy temperatura smażenia lub pieczenia jest bardzo wysoka. W wyniku reakcji pyrolizy z białek i tłuszczu powstają wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Natomiast w reakcji Maillarda w temperaturze przekraczającej 125°C z aminokwasów, kreatyniny i cukrów powstają aminy heterocykliczne (HCA). Pieczone czerwone mięso jest głównym źródłem HCA, podczas gdy mięso grillowane i opiekane na rożnie zawiera znaczne ilości WWA. WWA i HCA są niebezpiecznymi związkami, które mogą się przyczyniać do nasilenia procesów kancerogennych. Im wyższa temperatura obróbki, tym większa zawartość związków kancerogennych w potrawie. Substancje te mają zdolność do przenikania lipidowych błon komórkowych i akumulacji w tkance tłuszczowej.

Eliminacja lipofilnych ksenobiotyków jest uzależniona od ich metabolicznej transformacji przede wszystkim w wątrobie. Heterocykliczne związki aromatyczne przechodzą te same szlaki detoksyfikujące co np. estrogeny, współzawodnicząc o metabolizujące je enzymy i modulując działanie na komórki i organizm. Wysoka ekspozycja na ksenobiotyki w połączeniu z wysokim stężeniem estrogenów w organizmie może prowadzić do kompetycyjnej inhibicji enzymów detoksyfikujących ak-

tywne związki aromatyczne, co prowadzi do utraty równowagi oksydacyjno-redukcyjnej przez nasilenie produkcji reaktywnych form tlenu oraz do bezpośredniego uszkodzania materiału genetycznego przez tworzenie adduktów DNA.

Procesy detoksyfikacji przebiegają w dwóch fazach i aby skutecznie usuwać ksenobiotyki z organizmu, obydwa etapy muszą toczyć się w zbilansowany sposób. Brak zachowania równowagi pomiędzy hydroksylacją a koniugacją może w konsekwencji prowadzić do utraty stabilności genetycznej komórek. Enzymy I fazy detoksyfikacji (hydroksylazy z grupy cytochromu P450) katalizują reakcję jednoelektronowego utlenienia do aktywnych rodnikowych pochodnych. Powstałe w I fazie związki są lepiej rozpuszczalne w wodzie i następnie są koniugowane z grupami metylowymi, sulfurowymi lub glutationem przez enzymy II fazy. W tej postaci mogą być wydalone z organizmu.

Aktywowane metabolicznie w I fazie związki aromatyczne mogą tworzyć addukty z zasadami azotowymi w DNA. Addukty DNA są stabilne lub depurynujące w zależności od miejsca ataku elektrofilowego węglowodorów aromatycznych na zasadę azotową. Silniejszy potencjał mutageny mają addukty depurynujące, w wyniku których pozostaje w nici DNA puste miejsce purynowe, zwiększające ryzyko błędnej naprawy lub nieprawidłowej syntezy materiału genetycznego. Utrwalenie takich błędów w postaci mutacji w obrębie protoonkogenów i/lub genów supresorowych grozi utratą kontroli nad podziałami komórkowymi oraz transformacjami nowotworowymi.

Obecność aktywowanych związków heterocyklicznych może prowadzić do nasilenia się stanu stresu oksydacyjnego. W trakcie cyklicznych reakcji utleniania i redukcji hydroksylowych pochodnych związków aromatycznych z udziałem tlenu cząsteczkowego generowany jest anionorodnik ponadtlenkowy. Może być on redukowany enzymatycznie lub nieenzymatycznie do nadtlenku wodoru i dalej do innych reaktywnych form tlenu (RFT). Produkty pośrednie tych przemian mają wystarczający potencjał, aby modyfikować zasady azotowe, wprowadzać pojedyncze pęknięcia do nici i inne oksydacyjne uszkodzenia DNA.

Zaburzenie homeostazy powoduje, że RFT bezpośrednio uszkodzają DNA. Oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe mogą działać potencjalnie mutagenie lub blokować proces replikacji DNA.

Ponadto aktywowane pochodne HCA i WWA oraz generowane przez nie reaktywne formy tlenu muszą być zmiatane przez komórkowe systemy antyoksydacyjne (dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza, peroksydazy glutationowe). Przy dużym nadmiarze elektrofilowych substratów może dojść do wyczerpania przeciwutleniających systemów ochronnych i nasilenia się stresu tlenowego w komórkach.

Aktywne pochodne ksenobiotyków mogą również wiązać się kowalencyjnie do białek lub też je modyfikować oksydacyjnie, co sprzyja powstaniu krzyżowych wiązań z kwasem deoksyrybonukleinowym i wprowadza zaburzenia do jego struktury, prowadząc do zahamowania replikacji. Jeżeli zostaną uszkodzone białka odpowiedzialne za replikację i naprawę DNA, to przebieg tych procesów zostanie zakłócony. Hydroksylowane aromatyczne węglowodory mogą również reagować z lipidami, np. w błonach komórkowych, i prowadzić do wzmożonej peroksydacji kwasów tłuszczowych. Wreszcie RFT generowane przez metabolity WWA mogą modulować sygnalizację wewnątrzkomórkową, prowadząc do poważnych zaburzeń w regulacji ekspresji genów. Wszystkie te procesy mogą skutkować kancerogenezą.

Podobieństwo strukturalne WWA do naturalnych substancji steroidowych sprawia, że ich działanie może naśladować działanie hormonów. Istnieją specyficzne receptory wewnątrzkomórkowe rozpoznające węglowodory aromatyczne AhR (*aryl hydrocarbon receptor*), które oddziałują na ekspresję genów związanych np. z katabolizmem związków heterocyklicznych, analogicznie do szlaków sygnalizacji estrogenów. Receptory wewnątrzkomórkowe po związaniu liganda stanowią silne stymulatory transkrypcji genów, w tym również tych zaangażowanych w proliferację komórek. Ponadto jednoniciowe DNA występujące podczas replikacji, jest bardziej podatne na uszkodzenia niż nieaktywne DNA o strukturze zamkniętej – dwuniciowe. Nagromadzenie się mutacji w obrębie genów lub rejonów regulatorowych odpowiedzialnych np. za proliferację, naprawę DNA czy apoptozę, może prowadzić do transformacji nowotworowej komórek.

WWA mają zdolność oddziaływania nie tylko z receptorami aryłowymi AhR, ale również z receptorami estrogenowymi ER. Stwierdzono, iż niektóre aromatyczne związki heterocykliczne mają zdolność wiązania się do receptorów estrogenowych, powodując m.in. niekontrolowaną stymulację wzrostu komórek. Różne WWA wykazują działanie proestrogenowe lub do niego antagonistyczne w zależności od swojej struktury, która determinuje siłę i sposób wiązania do receptorów.

Oddziaływanie mutagennych związków pochodzących z metabolizmu aromatycznych węglowodórów i amin heterocyklicznych i jednoczesna stymulacja podziałów komórkowych przez estrogeny może prowadzić do istotnego zwiększenia ryzyka zajścia kancerogenezy.

SPOSOBY POMIARU USZKODZEŃ DNA

W ostatnich latach do najczęściej stosowanych metod pomiaru ilości uszkodzeń DNA, należy elektroforeza pojedynczych komórek w żelu

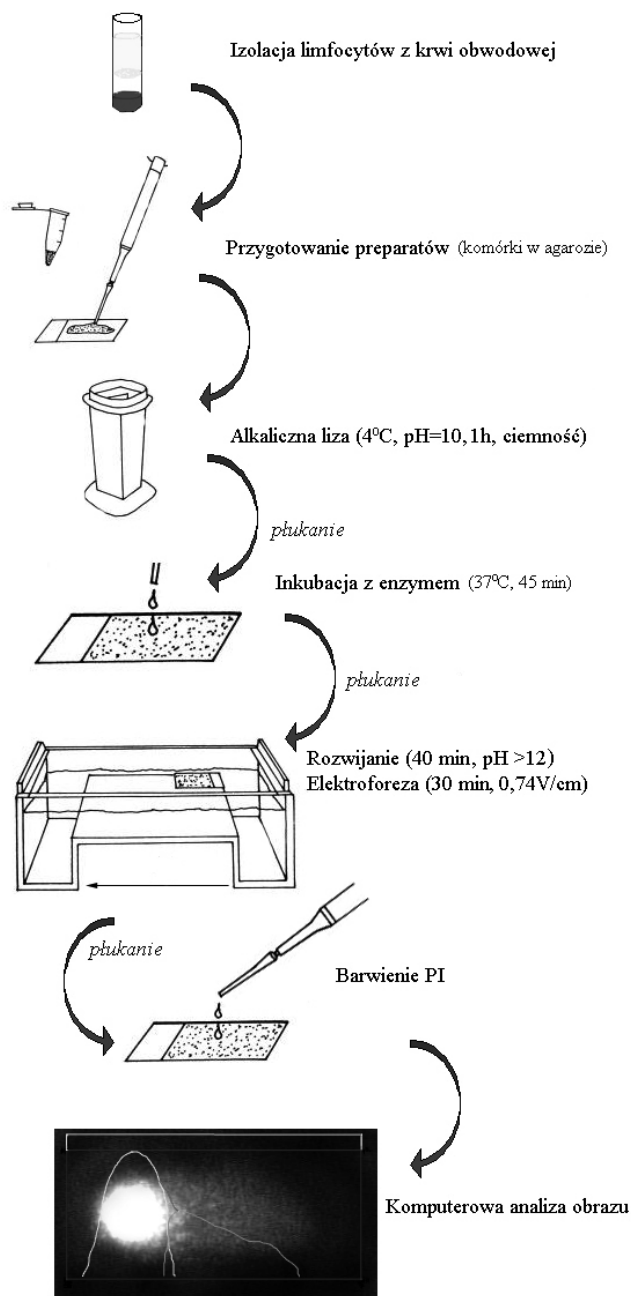
agarozowym, zwana metodą kometową. Należy ona do najczulszych sposobów oceny uszkodzeń materiału genetycznego, pozwalając na monitorowanie ich ilości na poziomie pojedynczych komórek.

Metoda kometowa opiera się na założeniu, iż materiał genetyczny w jądrze komórek zatopionych w agarozie, a następnie poddanych lizie, nie zmienia superhelikalnej struktury. Eukariotyczny DNA jest bardzo ściśle upakowany w jądrze komórkowym mającym średnicę 5–10 μm . Gdyby wszystkie chromosomy zostały ułożone liniowo, jeden za drugim, miałyby długość ok. 100 μm . Natomiast całkowita długość cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego zawartego w każdej komórce somatycznej człowieka wynosi ok. 1,8 m. Jego upakowanie przebiega na kilku poziomach.

Podwójna helisa DNA jądrowego, owinięta wokół rdzenia zbudowanego z białek histonowych, tworzy nukleosomy. Sznur nukleosomów zorganizowany jest w solenoid, który przez kolejne zwinięcia układa się w pętle stabilizowane białkami macierzy jądrowej. Upakowanie chromatyny jest tak silne, że inkubacja komórek w roztworze litycznym o bardzo wysokim stężeniu chlorku sodu (2,5 M) i silnie alkalicznym pH (>10) oraz w obecności niejonowego detergentu usuwa z chromatyny białka histonowe i część białek niehistonowych, pozostawiając nienaruszone superhelikalne zwoje. Pozostające struktury, nazywane „nukleoidami”, zawierają nagie DNA przyczepione do resztek macierzy jądrowej. Obecność pęknięć nici DNA powoduje, że struktura nukleoidu ulega rozluźnieniu, a luźne końce nici DNA mogą migrować w polu elektrycznym.

Poddanie preparatów z unieruchomionymi w żelu agarozowym nukleoidami niskonapięciowej elektroforezie (0,4–5 V/cm) powoduje wędrowkę pojedynczych nici DNA w kierunku anody przy równoczesnym zakotwiczeniu jednym końcem w resztkach białek zrębu jądrowego. Zastosowanie niskiego napięcia nie powoduje niebezpieczeństwa, że nie zostanie zerwana. Po wybarwieniu, pod mikroskopem fluorescencyjnym można obserwować jasno świecący nukleoid i fragmenty nici DNA, które wyemigrowały z jądra, przypominające odpowiednio: głowę i ogon komety. Ilość DNA migrującego w ogonie komety, a także długość jej ogona, jest wprost proporcjonalna do ilości uszkodzeń DNA.

Rycina 18. Schemat przebiegu elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym (metody kometowej) z inkubacją w enzymie rozpoznającym specyficzne modyfikacje zasad azotowych w DNA

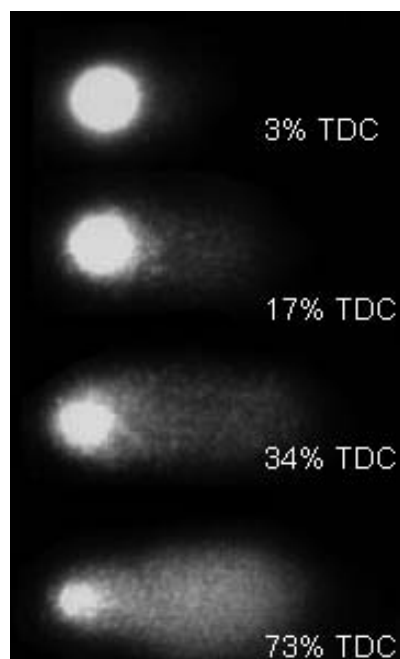


Źródło: opracowanie M. Kalemba-Drożdż na podstawie Tice 2000.

Użycie specyficznych glikozylaz po etapie lizy powoduje wycięcie rozpoznawanych przez nie zmodyfikowanych nukleotydów. W miejscu, w którym występowała uszkodzona zasada azotowa, zostanie wprowadzone pojedynczoniciowe pęknięcie, co w rezultacie powoduje wzrost stopnia migracji DNA do ogona komety. I tak w celu wykrycia modyfikacji oksydacyjnych pirymidyn i miejsc AP (apurynowych/apirymidynowych) używa się endonukleazy III wyizolowanej ze szczepu *Escherichia coli*. Natomiast białko Fpg (formamidopirymidynoglikozylaza) rozpoznaje produkty utlenienia puryn, szczególnie 2-deoksy-7,8-dihydro-8-oksygua노zynę (8-OH-dG). Podobnie użycie glikozylazy uracylowej pozwala na wykrycie błędnie wbudowanego do DNA uracylu.

W każdym preparacie zazwyczaj analizuje się po 50 komet. Liczba ta jest wystarczająca, by uzyskać wyniki wiarygodne statystycznie, pamiętając, aby na każdy punkt doświadczalny przygotować przynajmniej dwa preparaty.

Rycina 19. Przykładowe obrazy mikroskopowe komet o różnym poziomie uszkodzeń DNA, wyrażonych jako procentowa zawartość DNA w ogonie (% TDC)



Źródło: zdjęcia z badań własnych M. Kalemby-Drożdż.

INNE METODY WYKRYWANIA I SZACOWANIA ILOŚCI USZKODZEŃ DNA

Poziom uszkodzeń DNA można mierzyć na poziomie organizmu, komórki lub pojedynczych cząsteczek DNA. Pomiaru można dokonać bezpośrednio, badając ilość modyfikacji lub też pośrednio przez efektywność mechanizmów naprawczych, np. mierząc ilość zmodyfikowanych zasad w moczu pacjenta, wydalonych po wycięciu ich z DNA komórkowego w trakcie procesów naprawy materiału genetycznego. Obserwowany wzrost ilości zmodyfikowanych zasad w moczu może być także związany z nasileniem procesów naprawczych w komórce, a nie z poziomem wprowadzania uszkodzeń do DNA.

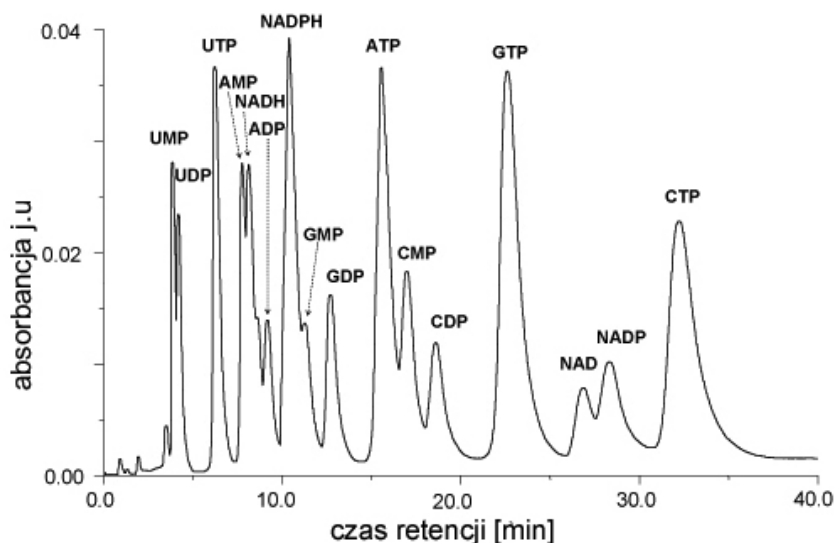
CHROMATOGRAFIA

Jedną z najczęściej stosowanych metod pomiaru ilości modyfikacji DNA jest chromatografia. DNA wyekstrahowane z badanej tkanki lub komórek poddawane jest hydrolizie kwasowej lub enzymatycznej. Pod wpływem kwasu mrówkowego oddysocjują wolne zasady azotowe. Natomiast w przypadku trawienia DNA enzymami: DNazami, fosfodiesterezazami i alkaliczną fosfatazą, powstaje mieszanina nukleotydów. Produkty hydrolizy rozdzielane są na kolumnie do chromatografii gazowej (GC) lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Detekcji dokonuje się elektrochemicznie, fluorymetrycznie lub za pomocą spektroskopii masowej. Pomimo iż metoda chromatografii cieczowej uznawana jest za najdokładniejszą, nie jest pozbawiona wad i pomiary te powinny zawsze być odnoszone do próbki referencyjnej. Podczas etapu trawienia DNA może dojść do wprowadzenia niekontrolowanej ilości uszkodzeń, a mimo dużej czułości tło pomiaru jest wysokie.

METODY CYTOGENETYCZNE

Kariotypowanie i hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (FISH) należą do grupy metod pozwalających zwizualizować uszkodzenia DNA w poszczególnych komórkach. W metodzie FISH stosuje się specyficzne znakowane fluorescencyjnie sondy, które hybrydują z docelowymi sekwencjami i umożliwiają zlokalizowanie pęknięcia chromosomu lub translokacji. Przygotowanie komórek do badania polega na usunięciu cytoplazmy i utrwaleniu jąder komórkowych. Na preparat jest nanoszona fluorescencyjna sonda i preparat jest następnie poddawany termicznej denaturacji, a następnie kilkugodzinnej hybrydyzacji. Po kilkukrotnym odpłukaniu preparatu całość jądrowego DNA jest wybarwiana związkiem fluorescencyjnym (DAPI) i analizowana w mikroskopie fluorescencyjnym.

Rycina 20. Przykładowy wynik rozdziału mieszaniny nukleotydów na kolumnie HPLC. Obecność zmodyfikowanych zasad lub adduktów spowodowałaby pojawienie się dodatkowych pików na chromatogramie



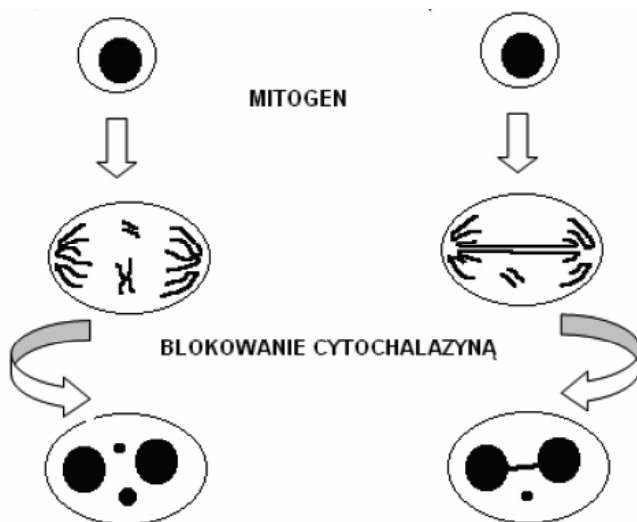
Źródło: wg Heckendorf 2011.

MIKROJĄDRA

Metoda analizy mikrojąder jest stosowana do oceny stopnia uszkodzenia chromosomów na poziomie pojedynczej komórki. Mikrojądra powstają z fragmentów chromosomów (a także z całych chromosomów), które nie zostały włączone do jąder potomnych podczas podziału komórkowego. Tworzenie się mikrojąder w dzielących się komórkach jest rezultatem pęknięć chromosomów na skutek nieskutecznie naprawionych uszkodzeń DNA lub nieprawidłowej segregacji chromosomów podczas podziału mitotycznego.

W metodzie tej stymuluje się komórki do podziału, natomiast po zakończonej kariokinezie blokowana jest cytokineza. Podczas kariokinezy fragmenty pękniętych chromosomów nie zostają przeciągnięte do jąder potomnych, ponieważ są pozbawione centromerów. W telofazie, wokół takich drobnych ziaren chromatyny, również zostaje odtworzona błona jądrowa. Po utrwaleniu i wybarwieniu preparatów otrzymujemy obraz komórek dwujądrzastych, w których cytoplazmie obecne są niejądrowe skupienia chromatyny zwane mikrojądrami. Możliwy jest również pomiar liczby mikrojąder w dojrzałych, pozbawionych jąder komórkowych, erytrocytach.

Rycina 21. Schemat powstawania mikrojąder



Źródło: opracowanie A. Cierniak.

NIEPLANOWANA SYNTEZA DNA

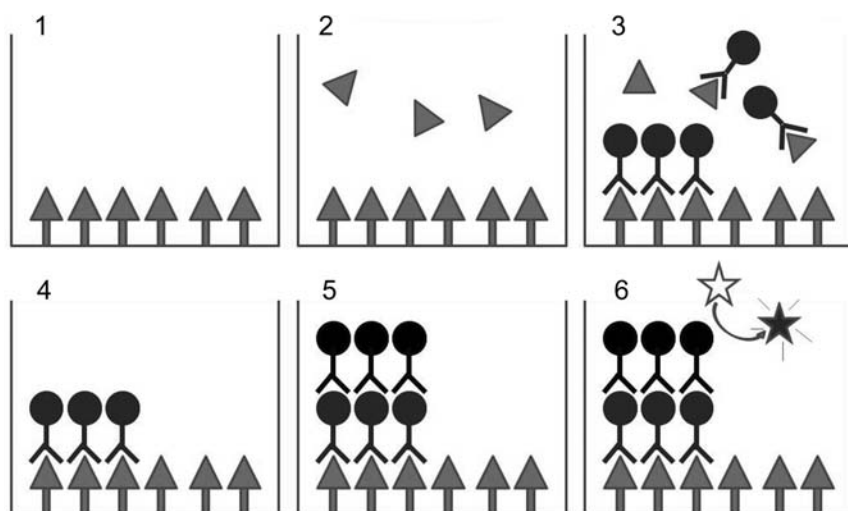
Techniką pośredniego oznaczenia uszkodzeń DNA jest badanie procesu naprawy uszkodzeń przez wykrywanie nieplanowanej syntezy DNA, zwanej metodą UDS (ang. *the unscheduled DNA synthesis*). Opiera się ona na wbudowywaniu trytowanej tymidyny do materiału genetycznego podczas naprawy DNA „przez wycinanie nukleotydów” (system NER – ang. *nucleotide excision repair*). Ilość wbudowanej tymidyny włączonej do DNA odzwierciedla ilość miejsc, w których przebiegał proces naprawy. Metoda ta dostarcza danych na temat przebiegu naprawy materiału genetycznego na poziomie poszczególnych komórek, jednak jest dosyć skomplikowana i charakteryzuje się niską czułością.

ELISA

Metoda immunoenzymatyczna polega na detekcji zmodyfikowanych zasad azotowych przy pomocy specyficznych do nich przeciwciał. Płytką 96-dołkową jest opłaszczoną zmodyfikowaną zasadą azotową, którą chcemy oznaczyć np. 8-oksoguaniną. Dodaje się badaną próbkę zawierającą utlenione guaniny i mianowaną liczbę przeciwciał rozpoznających 8-oksoguaninę, tzw. pierwszorzędowych. Ta wersja testu polega na kompetycyjnym wiązaniu substancji badanej i tej związanej z płytką. Po odpłukaniu wszystkich przeciwciał, które przyłączyły się

do badanej 8-oksoguaniny, pozostają tylko przeciwciała związane do 8-oksoguaniny opłaszczającej płytkę. Następnie dodawane są drugorzędowe przeciwciała wyznakowane enzymem rozpoznające przeciwciała pierwszorzędowe. Niezwiązany nadmiar przeciwciał drugorzędowych jest odpłukiwany, po czym dodaje się substratu dla enzymu. W wyniku reakcji powstaje barwny produkt, którego absorbancja jest proporcjonalna do liczby przeciwciał związanych na płytce. Czyli im więcej 8-oksoguaniny znajdowało się w badanej próbce, tym mniej przeciwciał anty-8-oksoguaninowych związało się do płytki, tym mniej aktywności enzymatycznej i tym niższa absorbancja.

Rycina 22. Schemat metody ELISA. 1 – płytka opłaszczona badaną substancją; 2 – dodanie próbki badanej substancji; 3 – dodanie przeciwciał rozpoznających badaną substancję; 4 – odpłukiwanie przeciwciał, które związały badaną substancję; 5 – rozpoznanie przeciwciał I-rzędowych przez znakowane enzymem przeciwciała II-rzędowe; 6 – dodanie substratu dla enzymu i reakcja barwna



Źródło: opracowanie M. Kalembe-Drożdż

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

CEL:

Zapoznanie z metodami oznaczania poziomu uszkodzeń DNA jako biomarkera stabilności genetycznej komórek.

Uwaga: do wykonania części laboratoryjnej potrzebny jest sprzęt wyszczególniony w protokołach metod oznaczania uszkodzeń DNA.

Zadanie 1: Przeprowadź pomiar ilości uszkodzeń DNA pod wpływem działania czynników utleniających (np. nadtlenek wodoru) za pomocą jednej z opisanych metod (załączniki 7 i 8: protokół izolacji limfocytów, protokół metody kometowej).

Druga opcja: dokonaj pomiaru ilości uszkodzeń DNA w limfocytach wyizolowanych z pełnej krwi lub ilości zmodyfikowanych nukleotydów obecnych w moczu u osób, które przez dwa tygodnie zażywały preparaty multiwitaminowe w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.

Jeśli laboratorium nie dysponuje odpowiednim sprzętem do przeprowadzenia pomiaru, skorzystaj z danych zamieszczonych w załącznikach nr 9 i 10 (surowe dane H_2O_2 , surowe dane kwercetyna).

Zadanie 2: Przygotuj 10-minutową prezentację na temat czynników zwiększających zdolności obronne i naprawcze organizmu. Skorzystaj z publikacji dostępnych w bibliotece lub internetowej bazie danych (np. PubMed, Science Direct).

Zadanie 3: Na podstawie danych doświadczalnych zanalizuj wpływ różnych stężeń czynnika uszkadzającego (nadtlenek wodoru) i ochronnego (kwercetyna) na ilość uszkodzeń w DNA limfocytów mierzonych metodą kometową połączoną z inkubacją z endonukleazą III?

W eksperymencie I limfocyty (wyizolowane z krwi zdrowego młodego dawcy) poddano 5-minutowej inkubacji z nadtlaniem wodoru w stężeniach od 10 μM do 400 μM . Następnie poddano komórki elektroforezie kometowej z endonukleazą III. Średnie wartości procentowe zawartości DNA w ogonie komety obliczone dla 100 komet (50 komet \times 2 preparaty) zawiera tabela 24. W eksperymencie II, przed przeprowadzeniem testu kometowego, limfocyty inkubowano przez godzinę z kwercetyną o stężeniach w granicach od 0,1 μM do 100 μM . Jednocześnie taką samą serię limfocytów inkubowanych z kwercetyną, po odpłukaniu, poddano działaniu nadtlenu wodoru o stężeniu 10 μM przez 5 min. Wyniki eksperymentu II zawiera tabela 25. Określ, w jaki sposób inkubacja ko-

mórek z kwercetyną wpływa na ilość uszkodzeń oksydacyjnych DNA? Jakie stężenie kwercetyny ma największą zdolność ochrony DNA przed uszkodzeniami oksydacyjnymi?

Tabela 24. Eksperyment I

Stężenie H_2O_2 [μM]	Uszkodzenia oksydacyjne DNA [%TDC]
kontrola	4,668
10	5,398
50	7,547
100	11,610
200	17,354
400	23,993

Tabela 25. Eksperyment II (Q – kwercetyna, ang. quercetin)

Stężenie kwercetyny [μM]	Uszkodzenia oksydacyjne DNA [% TDC]	Stężenie kwercetyny [μM] + $10\mu M H_2O_2$	Uszkodzenia oksydacyjne DNA [% TDC]
kontrola	4,645	kontrola + H_2O_2	5,876
0,1 μM Q	4,672	0,1 $\mu M \cdot Q$ + H_2O_2	3,947
1 μM Q	3,725	1 $\mu M \cdot Q$ + H_2O_2	3,497
10 μM Q	3,977	10 $\mu M \cdot Q$ + H_2O_2	4,485
25 μM Q	4,416	25 $\mu M \cdot Q$ + H_2O_2	5,785
50 μM Q	4,459	50 $\mu M \cdot Q$ + H_2O_2	5,395
100 μM Q	5,590	100 $\mu M \cdot Q$ + H_2O_2	7,423

Źródło: wyniki pochodzą z doświadczeń przeprowadzonych w Zakładzie Biochemii Ogólnej Wydziału Biotechnologii UJ, A. Cierniak, M. Kalemba-Drożdż.

Zadanie 4: Wykorzystaj dane uzyskane z zadania 4 z ćwiczeń na temat polimorfizmu genetycznego (rozdział 14), dotyczące wpływu polimorfizmu genu MTHFR (reduktaza metylenotetrahydrofolianowa) na stężenie folianów we krwi.

Zapoznaj się z literaturą dotyczącą wpływu polimorfizmu genu MTHFR na stabilność genetyczną komórek. Zanalizuj wpływ polimorfizmu MTHFR, poziomu spożycia kwasu foliowego i stężenia folianów we krwi na stabilność genetyczną limfocytów wyrażoną jako ilość uszkodzeń oksydacyjnych zasad azotowych DNA i błędnie wbudowanego uracylu do DNA. Poziom uszkodzeń mierzono przy użyciu zmodyfikowanej metody kometowej połączonej z inkubacją z endonukleazą III (wykrywanie modyfikacji oksydacyjnych pirymidyn) oraz z glikozylazą uracylową (wykrywanie uracylu błędnie wbudowanego do DNA). Czy

na poziom uszkodzeń ma wpływ stężenie folianów we krwi lub poziom spożycia kwasu foliowego? Jak zmienia się ilość uszkodzeń DNA po suplementacji diety 400 µg kwasu foliowego dziennie przez cztery tygodnie?

Tabela 26. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych DNA oraz błędnie wbudowanego uracylu do DNA w limfocytach (mierzonych za pomocą metody kometowej) młodych zdrowych kobiet (N=20) przed i po suplementacji diety kwasem foliowym (400µg/dzień/4 tygodnie)

Osoba	Błędnie wbudowany uracyl przed suplementacją	Błędnie wbudowany uracyl po suplementacji	Błędnie wbudowany uracyl po-przed	Uszkodzenia oksydacyjne DNA [% TDC] przed suplementacją	Uszkodzenia oksydacyjne DNA [% TDC] po suplementacji	Uszkodzenia oksydacyjne po-przed
1	4,014	1,586	-2,428	8,356	4,299	-4,057
2	4,780	3,588	-1,192	4,469	4,278	-0,191
3	3,268	1,634	-1,634	6,162	5,545	-0,618
4	5,020	2,850	-2,170	3,320	3,101	-0,219
5	5,382	4,988	-0,395	9,939	4,715	-5,224
6	1,341	2,524	1,183	4,488	2,624	-1,864
7	8,414	1,838	-6,576	6,086	2,262	-3,824
8	3,210	1,476	-1,734	4,367	3,215	-1,152
9	4,308	2,087	-2,220	2,429	2,680	0,251
10	3,792	1,908	-1,884	3,436	3,106	-0,331
11	7,066	2,216	-4,849	5,380	3,779	-1,601
12	2,900	2,837	-0,063	5,719	3,821	-1,898
13	7,200	2,196	-5,004	5,540	5,652	0,111
14	3,389	1,959	-1,430	6,723	3,076	-3,647
15	6,578	4,308	-2,271	6,534	6,098	-0,436
16	2,560	2,177	-0,383	7,758	6,201	-1,557
17	2,082	3,051	0,969	4,979	4,357	-0,622
18	9,666	1,697	-7,969	7,343	3,809	-3,533
19	6,877	2,051	-4,825	4,986	5,174	0,188
20	7,666	3,268	-4,398	7,163	1,700	-5,463

Źródło: wyniki pochodzą z doświadczeń przeprowadzonych w Zakładzie Biochemii Ogólnej Wydziału Biotechnologii UJ, M. Kalemba-Drożdż, U. Wojciech.

Tabela 27. Poziom spożycia kwasu foliowego przez 20 młodych zdrowych kobiet przed i po suplementacji diety kwasem foliowym (400µg/dzień/4 tygodnie)

Osoba	Spożycie kwasu foliowego [% RDA] przed suplementacją	Spożycie kwasu foliowego [% RDA] po suplementacji	Polimorfizm MTHFR (wprowadź dane z zadania 4 pod rozdziałem 14)
1	81,66	219,59	
2	70,03	207,95	
3	75,62	213,56	
4	61,69	199,63	
5	56,88	194,82	
6	77,52	215,45	
7	80,95	218,89	
8	70,01	207,94	
9	35,87	173,80	
10	104,81	242,74	
11	161,29	299,22	
12	75,72	223,87	
13	86,86	224,79	
14	48,88	186,82	
15	63,25	201,19	
16	72,97	210,90	
17	73,93	211,85	
18	91,49	229,43	
19	55,90	205,10	
20	66,17	204,10	

Źródło: wyniki z badań własnych M. Kalemba-Drożdż, U. Wojciech.

Zadanie 5: Na podstawie danych doświadczalnych zanalizuj wpływ różnych stężeń czynnika uszkadzającego (heterocykliczna amina PhIP 2-amino-1-metylo-6-fenilo-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna) i ochronnego (kurkumina) na ilość uszkodzeń w DNA limfocytów pochodzących od zdrowych dawców i pacjentów z nowotworem jelita grubego mierzonych metodą kometową.

W eksperymencie I limfocyty (wyizolowane z krwi zdrowych dawców, N=10 oraz od pacjentów z nowotworem jelita grubego N=10) poddano 1-godzinnej inkubacji z heterocykliczną aminą aromatyczną PhIP w stężeniach 25 µM–100 µM. Następnie poddano komórki elektroforezie kometowej. Średnie wartości procentowe zawartości DNA w ogonie komety obliczone dla 200 komet (50 komet × 2 preparaty w dwóch

niezależnych powtórzeniach) zawiera tabela 28. W eksperymencie II, limfocyty zarówno od pacjentów z nowotworem jelita grubego, jak i od zdrowych dawców inkubowano przez godzinę z kurkumina o stężeniach 1 μM –50 μM . Jednocześnie taką samą serię limfocytów inkubowano z kurkumina w stężeniach 1 μM –50 μM i równocześnie z heterocykliczną aminą aromatyczną PhIP w stężeniu 100 μM . Wyniki eksperymentu II zawiera

Tabela 29. Określ, w jaki sposób inkubacja komórek z PhIP lub z kurkumina wpływa na ilość uszkodzeń DNA? Jakie stężenie kurkuminy ma największą zdolność ochrony DNA przed uszkodzeniami PhIP? Jakie różnice występują pomiędzy uszkodzeniami od zdrowych dawców a pacjentów z nowotworem jelita grubego?

Tabela 28. Eksperyment I

Stężenie PhIP [μM]	Uszkodzenia DNA [% TDC] u zdrowych dawców	Uszkodzenia DNA [% TDC] u pacjentów z nowotworem jelita grubego
kontrola	10,38	14,26
25	12,97	19,01
50	13,99	22,32
75	15,06	22,20
100	17,41	24,71

Tabela 29. Eksperyment II

Stężenie kurkuminy [μM]	Uszkodzenia DNA [% TDC] u zdrowych dawców	Uszkodzenia DNA [% TDC] u pacjentów z nowotworem jelita grubego
kontrola	10,38	14,26
1	10,44	12,16
5	9,75	14,87
10	10,25	15,88
50	12,59	17,46
Kurkumina [μM] + 100 μM PhIP	Uszkodzenia DNA [% TDC] u zdrowych dawców	Uszkodzenia DNA [% TDC] u pacjentów z nowotworem jelita grubego
1	12,26	13,67
5	10,13	13,26
10	13,86	16,30
50	15,30	19,30

Źródło: wyniki pochodzą z doświadczeń przeprowadzonych w Zakładzie Biochemii Ogólnej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, A. Łabno, M. Winiarski, A. Cierniak

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Cierniak A., Kapiszewska M., *Metoda mikrojąderek w badaniach epidemiologicznych*, „Postępy Biologii Komórki” t. 29, 2002, z. 3, s. 365–377.

Cierniak A., Papież M., Kapiszewska M., *Modulatory effect of quercetin on DNA damage, induced by etoposide in bone marrow cells and on changes in the activity of antioxidant enzymes in rats*, „Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku”, vol 49, 2004, supl. 1, s. 167–169.

Collins A.R., et al., *Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?*, „Archives of Biochemistry and Biophysics” vol. 423, 2004, nr 1, s. 57–65.

Collins A.R., Horváthová E., *Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay*, „Biochemical Society Transactions”, vol. 29, 2001, nr 2, s. 337–341.

European Standards Committee On Oxidative DNA Damage (ES-CODD). *Measurement Of Dna Oxidation In Human Cells By Chromatographic And Enzymic Methods*. „Free Radical Biology & Medicine”, vol 34, 2003, nr 8, s. 1089–1099.

Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S., *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance*, „Mutation Research”, vol. 567, 2004, nr 1, s. 1–61.

Jałoszyński P., Kujawski M., Szyfter K., *Elektroforeza pojedynczych komórek (comet assay) – użyteczna technika badania uszkodzeń DNA*, „Postępy Biologii Komórki”, t. 23, 1996, s. 339–354.

Kalemba-Drożdż M., *Niedobory dietetyczne u młodzieży akademickiej*, [w:] *Zagrożenia zdrowotne wśród dzieci i młodzieży*, red. M. Seń, G. Dębska, Kraków 2012, s. 25–33.

Kalemba M. et al., *The Increased Amount of Vitamin B₁₂ in Serum Is Needed to Minimize the Uracil Misincorporation into DNA During Folate Supplementation*, „Trends in Food Science and Technology”, vol. 16, 2005, nr 6–7, s. 317–320.

Kapiszewska M., et al., *The Estrogenic Status and the COMT Genotype of Female Blood Donors Influence the Protective Ability of the Mediterranean Plant Extracts against the Hydrogen Peroxide-induced DNA Damage in Lymphocytes*, „Journal of Physiology and Pharmacology”, vol. 56, 2005, supl. 1, s. 199–217.

Kapiszewska M., et al., *The Level of Endogenous DNA Damage in Lymphocytes Isolated from Blood is Associated with the Fluctuation of 17 β -estradiol Concentration in the Follicular Phase of Healthy Young Women*, „Acta Biochimica Polonica”, vol. 52, 2005, nr 2, s. 535–539.

Mayne S.T., *Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research*, „The Journal of Nutrition”, vol 133, 2003, supl. 3, s. 933S–940S.

Tice, R.R., et al., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 2000. 35(3): p. 206–21.

Heckendorf A., Alpert A. Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography: Using One Mode to Tune Retention from a Second Mode. *LCGC Europe*, 2011, Volume 24, Issue 1, pp. 10–15.

16. Zagadnienia zdrowia publicznego związane z odżywianiem, nadwagą i otyłością

Zapoznaj się ze Sprawozdaniem (załącznik nr 1) w sprawie białej książki na temat zagadnień zdrowotnych związanych z odżywianiem, nadwagą i otyłością (2007/2285(INI)) złożonym przez Komisję Ochrony Środowiska Naturalnego, Zdrowia Publicznego i Bezpieczeństwa Żywności w Parlamencie Europejskim, dostępnym na stronie internetowej:

(www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+REPORT+A6-2008-0256+0+DOC+XML+V0//PL).

Zadanie 1: Na podstawie powyższej rezolucji sporządź jednostronnicowy tekst obejmujący, twoim zdaniem, najistotniejsze zagadnienia.

Zadanie 2: Zaplanuj akcję społeczną (film, plakat, ulotki itp.), której sens oddawałby zalecenia pojawiające się w sprawozdaniu.

Zadanie 3: Zapoznaj się ze stroną internetową: www.ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/platform/platform_en.htm

Przeprowadź dyskusję na zawarte tam tematy. Które z poruszanych zagadnień wydają Ci się najbardziej pilne, a które najtrudniejsze do realizacji?

Literatura podstawowa

- Kapiszewska M., *Ryzyko w kilogramach. Udział odżywiania w homeostazie metabolicznej*, Kraków–Krzeszowice 2000.
- Keller J.S., *Podstawy fizjologii żywienia człowieka*, Warszawa 2001.
- Kompendium wiedzy o żywności, żywieniu i zdrowiu*, red. J. Gawęcki, T. Mossor-Pietraszewska, Warszawa 2006.
- Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., *Tabele składu i wartości odżywczej żywności*, Warszawa 2005.
- Normy żywienia człowieka. Podstawy prewencji otyłości i chorób niezakaźnych*, red. M. Jarosz, B. Bułhak-Jachymczyk, Warszawa 2006.
- Podstawy nauki o żywieniu człowieka. Przewodnik do ćwiczeń*, red. W. Roszkowski, Warszawa 2005.
- Szponar L., Wolnicka K., Rychlik E., *Album fotografii produktów i potraw*, Warszawa 2008.
- Willett W.C., Skerrett P.J., *Eat, Drink, and Be Healthy*, New York–London–Toronto–Sydney 2005.
- Żywienie człowieka*, t. 1: *Podstawy żywienia człowieka*, red. J. Gawęcki, L. Hryniewiecki, Warszawa 2006.
- Żywienie człowieka*, t. 2, *Żywienie człowieka zdrowego i chorego*, red. J. Gawęcki, J. Hasik, Warszawa 2008.

Wykaz tabel i rycin zamieszczonych w tekście

Tabela 1. Zakresy wskaźnika masy ciała z uwzględnieniem płci	14
Rycina 1. Nomogram do wyznaczania współczynnika masy ciała (BMI).....	15
Tabela 2. Określanie budowy kośćca metodą pomiaru obwodu nadgarstka.....	15
Tabela 3. Zakres optymalnej masy ciała uwzględniającej budowę kośćca	16
Tabela 4. Rekomendowana procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie z uwzględnieniem płci i wieku badanej osoby.....	17
Tabela 5. Procentowy udział tkanki tłuszczowej w organizmie w zależności od grubości fałdu skórniego nad mięśniem trójęgłowym ramienia	18
Rycina 2. Nomogram do obliczania powierzchni skóry człowieka	26
Tabela 6. Współczynniki podstawowego zapotrzebowania energetycznego na 1 m ² powierzchni skóry w ciągu jednej godziny	26
Tabela 7. Współczynniki do obliczenia całkowitego wydatku energetycznego w zależności od stopnia aktywności zawodowej i pozazawodowej	27
Tabela 8. Przykładowa klasyfikacja aktywności życiowej według wykonywanych czynności.....	28
Tabela 9. Ilość energii wydatkowanej podczas wykonywania różnych form aktywności	29
Rycina 3. Nomogram do wyliczania zapotrzebowania energetycznego	32

Tabela 10. Zawartość węglowodanów i błonnika w 100 g produktów spożywczych.....	36
Tabela 11. Zawartość błonnika (g) na 100 g produktu.....	40
Rycina 4. Porównanie zmian stężenia glukozy we krwi po spożyciu produktów o wysokim i niskim indeksie glikemicznym.....	43
Rycina 5. Uproszczony schemat procesów katabolicznych w organizmie.....	48
Tabela 12. Bilans energetyczny metabolizmu tlenowego jednej cząsteczki glukozy.....	49
Tabela 13. Szybkość produkcji ATP w procesach aerobowych i anaerobowych.....	50
Rycina 6. Procentowy udział procesów tlenowych i beztlenowych w czasie trwania wysiłku fizycznego.....	50
Rycina 7. Zależność między intensywnością pracy a pochłanianiem tlenu przez organizm (V_{O_2}).....	52
Rycina 8. Intensywność pobierania tlenu w trakcie i po zakończeniu wysiłku fizycznego.....	53
Tabela 14. Zależność pomiędzy częstotliwością skurczów serca, ilością zużywanej energii a stopniem ciężkości wysiłku fizycznego.....	56
Rycina 9. Zmodyfikowana piramida żywieniowa.....	68
Rycina 10. Zasada połowy talerza	70R
Rycina 11. Schemat do rozrysowania własnej piramidy żywieniowej. Metodę można uszczegółowić, zakreślając warzywa w kratkach parzystych a owoce w nieparzystych, podobnie z białkami: roślinne w parzystych, a zwierzęce w nieparzystych.....	71
Rycina 12. Przykłady prawidłowo (A i B) i nieprawidłowo (C i D) skomponowanej diety	72
Tabela 15. Osobisty plan poprawy zdrowia	74
Tabela 16. Przygotowanie roztworu FRAP1.....	98
Tabela 17. Seria rozcieńczeń 1 mM $FeSO_4$ potrzebnych do wykonania krzywej standardowej.....	98
Tabela 18. Sporządzanie roztworu FRAP2.....	99
Rycina 13. Przykładowa krzywa standardowa w metodzie FRAP.....	100
Rycina 14. Wzór chemiczny sześciu klas flawonoidów, przedstawiciele i źródła występowania	104
Tabela 19. Występowanie antocyjanów w owocach jadalnych.....	104

Rycina 15. Wzór strukturalny kwercetyny	105
Tabela 20. Antocyjaniny używane jako naturalne barwniki produktów spożywczych	108
Tabela 21. Średnia zawartość witaminy C w owocach i warzywach [mg/100 g]	114
Rycina 16. Schemat szlaków metabolicznych z udziałem kwasu foliowego	119
Tabela 22. Stężenie folianów we krwi przed i po suplementacji diety kwasem foliowym (400µg/dzień/4 tygodnie) u 20 młodych zdrowych kobiet	120
Tabela 23. Częstość występowania polimorfizmów genu MTHFR w pozycji 677 i 1298 w różnych populacjach	122
Rycina 18. Schemat przebiegu elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym (metody kometowej) z inkubacją w enzymie rozpoznającym specyficzne modyfikacje zasad azotowych w DNA	130
Rycina 19. Przykładowe obrazy mikroskopowe komet o różnym poziomie uszkodzeń DNA, wyrażonych jako procentowa zawartość DNA w ogonie (% TDC)	131
Rycina 20. Przykładowy wynik rozdziału mieszaniny nukleotydów na kolumnie HPLC. Obecność zmodyfikowanych zasad lub adduktów spowodowałyby pojawienie się dodatkowych pików na chromatogramie	133
Rycina 21. Schemat powstawania mikrojąder	134
Rycina 22. Schemat metody ELISA. 1 – płytka opłaszczona badaną substancją; 2 – dodanie próbki badanej substancji 3 – dodanie przeciwciał rozpoznających badaną substancję; 4 – odpłukanie przeciwciał, które związały badaną substancję; 5 – rozpoznanie przeciwciał I-rzędowych przez znakowane enzymem przeciwciała II-rzędowe; 6 – dodanie substratu dla enzymu i reakcja barwna .	135
Tabela 24. Eksperyment I	137
Tabela 25. Eksperyment II (Q – kwercetyna, ang. quercetin)	137
Tabela 26. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych DNA oraz błędnie wbudowanego uracylu do DNA w limfocytach (mierzonych za pomocą metody kometowej) młodych zdrowych kobiet (N=20) przed i po suplementacji diety kwasem foliowym (400µg/dzień/4 tygodnie)	138

Tabela 27. Poziom spożycia kwasu foliowego przez 20 młodych zdrowych kobiet przed i po suplementacji diety kwasem foliowym (400µg/dzień/4 tygodnie)	139
Tabela 28. Eksperyment I	140
Tabela 29. Eksperyment I	140

Aneks

WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW

UWAGA: załączniki nr 1, 2, 4, 6–11) do pobrania pod adresem:
<http://www.ka.edu.pl/zinm/publikacje>

Załącznik nr 1. Rezolucja w sprawie białej księgi

Załącznik nr 2. Nomogram zapotrzebowania energetycznego w wysokiej rozdzielczości

Załącznik nr 3. Indeks glikemiczny – tabela

Załącznik nr 4. Instrukcja obsługi monitora pracy serca typu Polar

Załącznik nr 5a. M. Kalembe, U. Wojciech, T. Milewicz, M. Kapiszewska,
The Increased Amount of Vitamin B₁₂ in Serum Is Needed to Minimize the Uracil Misincorporation into DNA During Folate Supplementation

Załącznik nr 5b. M. Kalembe-Drożdż, S. Matusik, T. M. Kapiszewska,
Udział metabolitów pośrednich w metabolizmie estrogenów w uszkodzeniach oksydacyjnych DNA kobiet w ciąży analizowany metodą ścieżek

Załącznik nr 5c. M. Kalembe-Drożdż, *Niedobory folianów w diecie i ich wpływ na stabilność genetyczną*

Załącznik nr 5d. M. Kalembe-Drożdż, M. Kapiszewska, *Polimorfizm genów odpowiedzialnych za metabolizm estradiolu a ryzyko nowotworów hormonozależnych*

Załącznik nr 6. Protokół metody PCR RFLP dla polimorfizmu genu MTHFR

Załącznik nr 7. Protokół izolacji limfocytów z krwi obwodowej

Załącznik nr 8 Protokół metody kometowej (elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym)

Załącznik nr 9. Surowe dane – wpływ H₂O₂ na uszkodzenia DNA (.xls)

Załącznik nr 10. Surowe dane – wpływ kwercetyny i H₂O₂ na uszkodzenia DNA (.xls)

Załącznik nr 11. M. Kapiszewska, *A Vegetable to Meat Consumption Ratio as a Relevant Factor Determining Cancer Preventive Diet. The Mediterranean versus Other European Countries.*

ZAŁĄCZNIK 3.

INDEKS GLIKEMICZNY (IG) PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH

PRODUKT	IG
Ananas	59
Arbuz	75
Bagietka - pieczywo francuskie	95
Banan	59
Banany dojrzałe	72
Baton Mars	65
Baton Twix	44
Biskopt	46
Brzoskwinie	29
Brzoskwinie z puszeki	52
Budyń	43
Buraki	65
Cebula	15
Chipsy	90
Chleb biały	95
Chleb pełnoziarnisty żytni	58
Chleb pszenny	85
Chleb pumpernikiel	40
Chleb żytni na zakwasie	55
Chrupki kukurydziane	63
Ciasto francuskie	59
Coca Cola	63
Cukier rafinowany	68
Czekolada biała	44
Czekolada gorzka	22
Czekolada mleczna	49
Czereśnie	22
Czosnek	15
Daktylę suszone	103

Dynia pieczona	75
Dżem truskawkowy	58
Fanta	68
Fasola biała	40
Fasola biała, ugotowana	33
Fasola czarna	30
Fasola płaskostrąkowa	46
Fasola szparagowa	71
Figi suszone	35
Fruktoza	20
Frytki	95
Glukoza	100
Grejpfrut	25
Groch gotowany	22
Groszek zielony	45
Groszek zielony z puszki	61
Gruszki	42
Herbatniki	57
Jabłka	38
Jabłka suszone	29
Jogurt 0% tłuszczu	27
Jogurt czysty bez cukru	15
Jogurt naturalny	36
Jogurt owocowy	36
Kasza gryczana ugotowana	54
Kasza jaglana, ugotowana	71
Kasza manna	58
Kiełki fasoli Mung	25
Kiwi	52
Kleik ryżowy	90
Knedle ziemniaczane	52
Kukurydza słodka	53
Kukurydza z puszki	55
Kuskus gotowany	65
Laktoza	46
Lody z pełnego mleka	61
Makaron	65

Mango	55
Marchewka gotowana	85
Marchewka świeża	30
Melon	65
Miód	87
Mleko odtłuszczone	32
Mleko pełne 3% tłuszczu	27
Mleko słodkie zagęszczone	61
Mleko zsiadłe	32
Morele suszone	30
Morele świeże	15
Nutella	33
Orzechy	22
Orzeszki ziemne prażone	14
Otręby owsiane	55
Płatki Cheerios	74
Płatki Chocapic	84
Płatki kukurydziane	84
Płatki owsiane błyskawiczne	85
Płatki ryżowe	80
Pomarańcza	44
Pomidory	15
Popcorn	72
Proso	70
Rodzynki	64
Ryba	38
Ryż Basmati gotowany	60
Ryż biały gotowany	70
Ryż brązowy gotowany	55
Ryż długoziarnisty gotowany	56
Rzepa	72
Soczewica zielona gotowana	30
Soja	14
Sok ananasowy	46
Sok grejpfrutowy	48
Sok jabłkowy	40
Sok pomarańczowy	52

Sok pomidorowy bez cukru	38
Sok z marchwi świeży	43
Śliwki	30
Truskawki	40
Wafle ryżowe	64
Winogrona	46
Wiśnie	25
Ziemniaki gotowane	95
Ziemniaki młode	57
Ziemniaki pieczone	85
Ziemniaki puree	90

ZAŁĄCZNIK 5B.

UDZIAŁ METABOLITÓW POŚREDNICH W METABOLIZMIE ESTROGENÓW W USZKODZENIACH OKSYDACYJNYCH DNA KOBIEŃ W CIĄŻY ANALIZOWANY METODĄ ŚCIEŻEK.¹

Małgorzata Kalemba-Drożdż*,
Stanisław Matusik**,
Tomasz Milewicz***,
Maria Kapiszewska*

*Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego;

** Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie,

***Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

STRESZCZENIE:

W okresie ciąży stężenie hormonów płciowych, m.in. 17 β -estradiolu (E2), progesteronu, a także metabolitów pośrednich takich jak DHEA czy cholesterol, będący substratem ulega drastycznej zmianie. Ten wzrost w stężeniu hormonów powoduje, że rośnie także stężenie potencjalnie genotoksycznych metabolitów rozkładu E2, czyli katecholi estrogenowych, które, jeśli nie zostaną usunięte w reakcji sprzęgania, mogą prowadzić do uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Powodem powstawania uszkodzeń są reaktywne formy tlenu (RFT) powstające w reakcjach między wolnorodnikowymi formami semichinonów i chinonów tych związków. Dzieje się tak jednak jedynie wtedy, gdy poziom RFT przekroczy zdolności antyoksydacyjne komórek. Taką ochronną rolę pełni także E2. Może to oznaczać, że powstające RFT, które są także cząsteczkami istotnymi dla sygnalizacji komórkowej podczas rozwoju płodu po spełnieniu swej roli są usuwane z komórek dzięki antyoksydacyjnym właściwościom E2. Pytanie

¹ Niniejszy maszynopis został opublikowany jako: Małgorzata Kalemba-Drożdż, Maria Kapiszewska. „*Udział metabolizmu estradiolu w utrzymaniu stabilności genetycznej komórek*” – [w:] *Środowisko i gospodarka hormonalna u kobiet*, t. II: *Zaburzenia w metabolizmie estrogenów i ich konsekwencje*, (red. nauk.) M. Kapiszewska, Kraków 2011, s. 159, 160.

zatem o rolę E2, a także innych produktów metabolizmu estrogenów, z punktu widzenia poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach, wydaje się pytaniem istotnym. Aby przybliżyć odpowiedź na to pytanie, sprawdzono poziom oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych i pirymidynowych w DNA limfocytów kobiet w ciąży (N=65) metodą kometową, zaś udział cholesterolu, E2, progesteronu i DHEA w poziomie tych uszkodzeń analizowano wykorzystując analizę ścieżek. Pokazana hierarchia wpływów tych metabolitów na uszkodzenia oksydacyjne DNA potwierdziła ochronną rolę E2, podczas gdy pozostałe związki wykazują dodatni efekt. Model ten jednak wyjaśnia zaledwie kilka procent zmienności w poziomie uszkodzeń.

Słowa kluczowe: hormony płciowe, 17 β -estradiol, uszkodzenia oksydacyjne DNA, analiza ścieżek

ABSTRACT:

Levels of sex hormones, including 17 β -estradiol (E2), progesterone, and intermediate metabolites, such as DHEA or cholesterol, a substrate for E2 production drastically change during pregnancy. This increase in concentration of hormones enhance amount of catechol estrogens metabolites of E2 degradations, that if is not removed by conjugation can lead to oxidative DNA damage. Catechol estrogens can be further oxidized to semiquinone and quinone, the molecules that represent reactive oxygen species (ROS). When the level of ROS exceeds the antioxidant capacity of cells that induce the oxidative DNA damage. However, ROS play also very important role in cellular signaling during development of fetus. Moreover, the antioxidant ability of E2 was also observed. This may mean that the generated ROS after fulfilling his role in the cells are removed by antioxidant properties of E2. Thus, the question about involvement and contribution of E2 and other its metabolic products in the level of strand breaks and oxidised pyrimidines and purines in DNA in cells during pregnancy appears to be very important. To answer this question we examined levels of these damage in lymphocytes of pregnant women (N = 65) using comet assay. Both direct and indirect effect through cholesterol, E2, DHEA and progesterone on the level of these lesions were analyzed using path modeling. The hierarchy of influence of these metabolites on DNA oxidative damage confirmed the protective role of E2, while the other compounds show opposite effect. This model, however, explains only a few percent variation in the level of damage.

Key words: sex hormones, 17 β -estradiol, oxidative DNA damage, path diagram

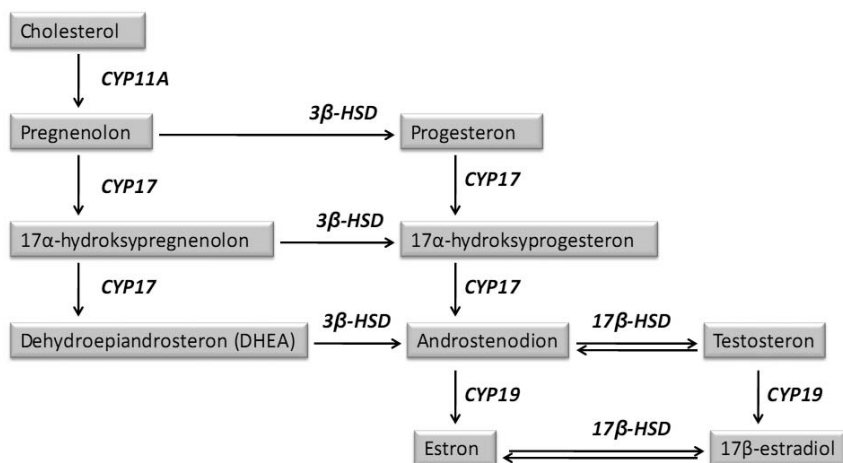
WPROWADZENIE:

Stres oksydacyjny jest efektem nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) powstających podczas metabolizmu w normalnych warunkach fizjologicznych, bądź jako odpowiedź organizmu na warunki środowiskowe. To zaburzenie homeostazy jest zwykle postrzegane jako czynnik destrukcyjny mogący prowadzić do uszkodzenia komórek i tkanek. W szczególności nienaprawione lub błędnie naprawione uszkodzenia w DNA mogą być przyczyną transformacji nowotworowych. Równocześnie RFT są ważnymi cząsteczkami biorącymi udział w sygnalizacji komórkowej uruchamiając transkrypcję lub produkcję cytokin. Procesem, w którym RFT odgrywają istotną rolę jest reprodukcyjny cykl życiowy u kobiet, zaczynając od dojrzewania komórek jajowych (oocytów), zapłodnienia, poprzez rozwój embrionu w całym okresie ciąży, do porodu włącznie. Stres oksydacyjny jest równocześnie czynnikiem szeregu klinicznie diagnozowanych zaburzeń takich jak: nadciśnienie podczas ciąży, rzucałka, niepłodność, powódzenie w zapłodnieniu *in vitro*, czy wzrost ryzyka poronienia. Zachowanie równowagi oksydacyjnej jest regulowane przez poziom enzymów antyoksydacyjnych, a także jest zależne od ilości spożywanych mikroelementów oraz witamin przeciwutleniających.

W artykule przedstawiono wyniki analiz udziału wybranych związków występujących w szlaku metabolicznym 17β -estradiolu (E2), a także ich procentowy udział w uszkodzeniach DNA ocenianych w limfocytach kobiet w ciąży mającej prawidłowy przebieg. Starano się ustalić: czy i w jakim stopniu istnieje związek przyczynowo-skutkowy między stężeniami 17β -estradiolu, progesteronu, DHEA, cholesterolu, a ilością uszkodzeń DNA. Analizy przeprowadzano metodą ścieżek umożliwiającą ocenę wielkości oddziaływania bezpośredniego i pośredniego poszczególnych standaryzowanych zmiennych niezależnych (egzogenicznych), którymi są stężenia metabolitów pośrednich, a także ustalono hierarchizację tych zmiennych pod względem wielkości wpływów na zmienną zależną, czyli poziom uszkodzeń alkali-labilnych oraz na poziom utlenionych zasad pirymidynowych i purynowych.

ZARYS METABOLIZMU HORMONÓW PŁCIOWYCH I ICH ZNACZENIE W OKRESIE CIĄŻY

Hormonami steroidowymi, które odgrywają najważniejszą rolę w rozwoju płciowym kobiety jest 17β -estradiol (E2) i progesteron. Ich synteza przedstawiona jest schematycznie na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat biosyntezy 17β-estradiolu.

Podczas rozwoju ciąży produkcja zarówno E2, jak i progesteronu jest przejmowana przez łożysko. Od końca 3 miesiąca to głównie ten narząd płodowy jest odpowiedzialny za utrzymanie wysokiego stężenia hormonów we krwi matki i dziecka. Sądzi się, że estrogeny mają tak duże znaczenie w trakcie życia płodowego, ponieważ wpływają na podniesienie poziomu acetylacji histonów, a tym samym na rozluźnienie konformacji chromatyny, przez co zwiększa się dostępność DNA dla kompleksu transkrypcyjnego umożliwiając ekspresję genów niezbędnych w rozwoju płodu (Pasqualini 2005). E2 łącząc się z receptorem estrogenowym kodowanymi przez niezależne geny ERα i ERβ zmienia jego konformację czyniąc go czynnikiem transkrypcyjnym. Tak uaktywnione receptory wiążą się do specyficznych sekwencji elementu odpowiedzi na estrogeny (ERE, ang. estrogen response element) obecnych w genach docelowych. Tym samym zmianie ulegają całe profile ekspresji genów w komórkach.

Stężenie hormonów płciowych u matki jest silnie skorelowane z ich stężeniem we krwi dziecka (Troisi 2003). Po porodzie poziom zarówno 17β-estradiolu, jak i progesteronu, gwałtownie spada do poziomu porównywalnego ze wczesną fazą folikularną. Poziom estrogenów w życiu płodowym może modulować podatność dziecka na zachorowanie na niektóre nowotwory w późniejszym wieku na przykład poprzez modyfikację zdolności komórek macierzystych do różnicowania (Baik 2005). W około 98% estrogeny i progesteron występują w postaci związanej z białkami osocza: albuminą oraz globuliną wiążącą sterydy płciowe (SHBG – Sex Hormon Binding Globulin). Jedynie około 2% tych hormo-

nów występuje w postaci wolnej w osoczu. Niezwiązane z białkami hormony sterydowe mają zdolność przenikania przez błonę komórkową i po związaniu z receptorem cytoplazmatycznym oddziałują na aparat genetyczny jądra komórkowego, stymulując komórkę do podziału.

W czasie ciąży stężenie 17β -estradiolu w organizmie kobiety wzrasta około 100-krotnie w porównaniu do poziomu w okresie owulacyjnym (Baik 2005, Milczarek 2007), zapewniając prawidłowy rozwój płodu, podtrzymanie ciąży oraz terminowy poród. Poziom płciowych hormonów steroidowych zależy w dużej mierze od czynników genetycznych, w czym znaczną rolę odgrywają posiadane polimorficzne allele genów kodujących enzymy syntezy (rodzina cytochromów P450) i katabolizmu estrogenów (CYP, COMT). Częstość występowania alleli genów kodujących niektóre z tych enzymów w rejonie Azji Wschodniej, a wpływających na aktywność enzymów jest różna od tej w Europie. Może to wpływać na stężenie E2. I tak na przykład u Azjatek poziom 17β -estradiolu jest istotnie niższy niż mierzony w analogicznej grupie kobiet rasy Kaukaskiej (Arslan 2006).

Progesteron, obok E2, jest najważniejszym hormonem steroidowym zaangażowanym w zdolności rozrodcze kobiety. Stanowi on również substrat do syntezy hormonów kory nadnerczy i testosteronu. Progesteron odpowiada za właściwe przygotowanie błony śluzowej macicy na przyjęcie zapłodnionego jaja oraz za utrzymanie ciąży. Stężenie progesteronu w surowicy służy w diagnostyce klinicznej do określenia zagrożenia utrzymania ciąży, jednak w praktyce nie można podać wartości stężeń progesteronu, na podstawie których można rokować co do przebiegu ciąży. Zdarza się, że nawet przy bardzo niskich stężeniach progesteronu ciąża rozwija się zupełnie prawidłowo (Brosens, Gellersen 2006).

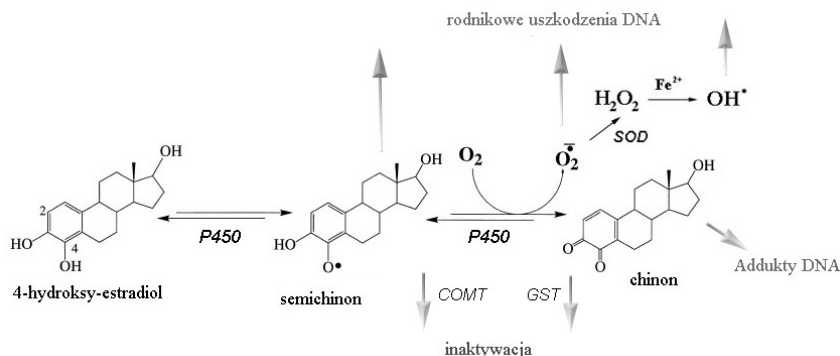
Dehydroepiandrosteron (DHEA) stanowi substrat do syntezy estrogenów. Oprócz różnicującego i antyapoptotycznego działania przekazywanego poprzez receptory androgenowe (AR), wykazuje własności przeciwutleniające. DHEA i DHEA-S może zapobiegać oksydacyjnym uszkodzeniom biomolekuł, jak również przywracać równowagę oksydacyjną komórek (Tunez 2005). Kora nadnerczy i wątroba płodu oraz ciężarnej kobiety, syntetyzują duże ilości DHEA i jego sulfopochodnej DHEA-S, które następnie w łożysku służą jako substrat do syntezy 17β -estradiolu. DHEA jest steroidem występującym w największych ilościach w ludzkim organizmie (Khalil 2000). Regulacja syntezy DHEA odbywa się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego ze stężeniem estrogenów. Poziom DHEA-S jest również regulowany przez IGF- β za pośrednictwem ER β .

USZKODZENIA OKSYDACYJNE DNA A HORMONY PŁCIOWE

Uszkodzenia w materiale genetycznym pojawiają się podczas całego okresu życia komórki. Ich poziom zależy od zachowania równowagi pomiędzy intensywnością ekspozycji na czynniki uszkadzające, tak endo- jak i egzogenne, a sprawnością systemów ochronnych i naprawczych. Ponadto komórki posiadają wiele możliwości naprawy uszkodzeń DNA.

Akumulacja uszkodzeń w DNA, prowadzi do utraty stabilności genetycznej i zwiększenia ryzyka rozwoju nowotworów. W trakcie replikacji do DNA wbudowywane są błędne zasady z częstotliwością około 1 na 10^6 nukleotydów. Wśród licznych oksydacyjnych uszkodzeń obecnych w cząsteczce DNA do najczęściej występujących należą: 8-oksoguanina (8-okso-G), 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna (8-okso-dG) oraz 2,4-diamino-5- formamidopirymidyna (Fapy- G). Uszkodzenia te znajdują się w centrum zainteresowań naukowców, gdyż charakteryzuje je wysoki mutagenny potencjał. Podniesiony poziom tych uszkodzeń obserwowano w tkankach różnych nowotworów, co sugeruje, że akumulacja oksydacyjnie uszkodzonych zasad azotowych DNA może odzwierciedlać wzrost ryzyka nowotworowego, ale także może być biomarkerem mającym znaczenie predykcyjne (Milczarek 2007, Pasqualini 2005).

Uszkodzenia oksydacyjne DNA powstają także wskutek autooksydacji katecholowych estrogenów powstających podczas katabolizmu estrogenów. Początkowo dochodzi do przekształcenia ich w formy lepiej rozpuszczalne w wodzie, po czym następuje inaktywacja i usunięcie ich z moczem. Enzymy I fazy detoksyfikacji (hydroksylazy z grupy cytochromu P450) katalizują powstanie hydroksylowych pochodnych estrogenów (poprzez hydroksylację w obrębie pierścienia A lub D), które następnie są koniugowane z grupami metylowymi, sulfurowymi lub glutationem przez enzymy II fazy [Yager 2000]. Katecholowe pochodne estrogenów mogą następnie ulegać utlenieniu przez cytochromy P450 do formy semichinonowej i dalej do chinonowej. Przy udziale NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450, mogą ulec redukcji z powrotem do postaci hydrochinonu. Oba procesy zachodzą poprzez wolnorodnikowe produkty pośrednie. Ponadto, chinonowe formy hydroksyestrogenów mogą reagować bezpośrednio z zasadami azotowymi w DNA tworząc addukty (Rycina 2).



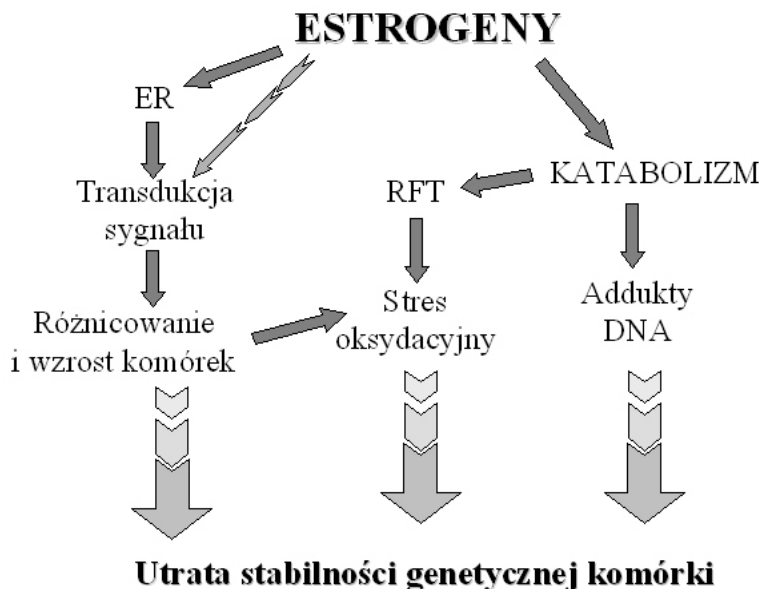
Rycina 2. Genotoksyczne działanie metabolitów estradiolu.

W trakcie cyklicznych reakcji utleniania i redukcji katecholowych pochodnych estrogenów i przechodzenia pomiędzy formami chinon – hydrochinon z udziałem tlenu cząsteczkowego generowane są duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego. Anionorodnik ponadtlenkowy może być redukowany enzymatycznie lub nieenzymatycznie do nad-tlenku wodoru i dalej do innych RFT. Może to prowadzić do nasilenia się stanu stresu oksydacyjnego w komórce.

Uszkodzenia DNA mogą zostać utrwalone w postaci mutacji w wyniku stymulującego proliferację działania estradiolu i w ten sposób zwiększać ryzyko kancerogenezy. Zaburzenie homeostazy powoduje także, że RFT bezpośrednio uszkadzają DNA. W wyniku oddziaływania reaktywnych form tlenu z zasadami azotowymi DNA powstają glikole tyminy i cytozyny, puryny o otwartych pierścieniach. Reaktywne formy tlenu powstają również w wyniku reakcji nieenzymatycznych pomiędzy estrogenami katecholowymi, czyli produktami hydroksylacji 17 β -estradiolu a jonami metali (Oliński 2007). Produkty pośrednie tych przemian mogą modyfikować zasady azotowe, wprowadzać pojedyncze pęknięcia do nici i inne oksydacyjne uszkodzenia DNA (Mitrinen, Hirvonen 2003). Endogenne metabolizmy estrogenów, a w szczególności szybkość usuwania estrogenów katecholowych, ma zatem bezpośredni wpływ na poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA (Baik 2005).

Po uwzględnieniu efektywnych procesów naprawczych ilość ta jest redukowana do 1 nukleotydu na 10¹⁰. Utrwalenie takiej zmiany w cyklu replikacyjnym skutkuje powstaniem mutacji punktowej. Wraz z kolejnymi podziałami komórkowymi, mutacje mogą ulegać akumulacji, a usytuowanie ich w genach supresorowych i protoonkogenach może doprowadzić do utraty kontroli nad podziałami komórkowymi oraz transformacji nowotworowej. Estrogeny w kompleksie z receptorami

estrogenowymi (ER) stanowią silne stymulatory transkrypcji genów, w tym również tych zaangażowanych w proliferację komórek. Ponadto stwierdzono, iż niektóre metabolity estrogenu mają zdolność kowalencyjnego wiązania się do receptorów estrogenowych powodując ciągłą stymulację wzrostu komórek (Kristensen 2003). Wszystko to może prowadzić do niestabilności genetycznej komórek prowadzącej często do transformacji nowotworowej (Ryc. 3).



Rycina 3. Kancerogenne działanie estrogenów.

Podczas ciąży w organizmie matki i dziecka powstają duże ilości reaktywnych form tlenu. RFT biorą udział w dojrzewaniu tkanek macicy, implantacji zarodka i rozwoju naczyń krwionośnych łożyska i macicy. Embriogeneza wiąże się z nasileniem stresu oksydacyjnego. W trakcie tego procesu RFT są zaangażowane w sygnalizację komórkową i kontrolę rozwoju płodu podczas replikacji i różnicowania komórek oraz w czasie formowania się organów (Aurousseau 2006). Metabolizm witamin i mikroelementów pomaga w utrzymaniu poziomu RFT na takim poziomie, aby nie zaburzać sygnalizacji, równocześnie jednak zapobiegając ich nadmiernej produkcji, co mogłoby doprowadzić do uszkodzenia tkanek płodu i matki lub uniemożliwić implantację zarodka (Seino 2002).

WSPÓŁZALEŻNOŚCI POMIĘDZY 17 β -ESTRADIOLEM A METABOLITAMI W SZLAKU METABOLICZNYM ESTROGENÓW:

Analizy zmian w stężeniu E2 pokazała, że stężenie żeńskich hormonów płciowych w organizmie ciężarnych kobiet (N=65) wzrasta w czasie kolejnych tygodni ciąży. Stwierdzono także, że przyrost ten miał charakter wykładniczy. Wraz z rosnącym stężeniem 17 β -estradiolu i dorażaniem ciąży zaobserwowano także spadek stężenia DHEA-S w surowicy. Taka zależność związana jest z ujemnym sprzężeniem zwrotnym kontrolującym stężenie DHEA przez stężenie 17 β -estradiolu (Labrie 2005).

W czasie ciąży istotne jest także utrzymanie wysokiego stężenia progesteronu. Synteza progesteronu zachodzi szlakiem niezależnym od syntezy DHEA, a hormon ten jest potencjalnym substratem do produkcji estrogenów. Analiza korelacji semicząstkowej pokazała, że progesteron ma trzykrotnie większy udział w zmianach stężenia 17 β -estradiolu w porównaniu do DHEA-S. Można jednak sądzić, że to wzrastające stężenie 17 β -estradiolu w okresie ciąży kontroluje zarówno stężenie progesteronu jak i DHEA w krążeniu matki (Pepe 1998).

Podczas ciąży obserwuje się także zmiany w metabolizmie lipidów. Stale rosnące stężenie cholesterolu jest niezbędne do nasilającej się syntezy hormonów płciowych. Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki pokazały, że stężenie całkowitego cholesterolu w surowicy silnie korelowało ze stężeniami 17 β -estradiolu i progesteronu we krwi.

Siła związku pomiędzy 17 β -estradiolem a cholesterolem, progesteronem i DHEA, oceniona przez obliczenie współczynników relacji Pearsona pokazała, że wraz ze wzrostem stężenia cholesterolu rośnie stężenie progesteronu oraz 17 β -estradiolu, a siła tego związku była większa dla 17 β -estradiolu ($r=0,687$); natomiast wraz ze wzrostem stężenia cholesterolu malało stężenie DHEA-S, a siła tego związku była bardzo mała ($r=-0,179$). Wraz ze wzrostem stężenia progesteronu malało także stężenie DHEA-S ($r=-0,256$). Najmniejsza siła związku występowała pomiędzy DHEA-S a 17 β -estradiolem ($r=0,011$).

Aby zmierzyć wkład, jaki poszczególne metabolity pośrednie (zmienne) wnoszą w zmiany stężenia 17 β -estradiolu, określono współczynniki korelacji cząstkowej i semicząstkowej. Największy współczynnik korelacji cząstkowej miał cholesterol ($r=0,568$). Wartość ta określa jego skorelowanie po uwzględnieniu jego skorelowania ze wszystkimi pozostałymi zmiennymi. Stężenie cholesterolu wyjaśniało samodzielnie prawie 19,2% ($0,438^2 \times 100\%$) wariancji stężenia 17 β -estradiolu, po wyłączeniu wpływu pozostałych badanych związków. Zaś proge-

steron miał większy wpływ (wyjaśnia 10,6% zmienności) na stężenie 17 β -estradiolu niż DHEA-S, który wyjaśniał jedynie 3,9% zmienności stężenia 17 β -estradiolu w czasie ciąży.

Natężenie wzajemnego oddziaływania wszystkich zmiennych niezależnych (cholesterolu, progesteronu i DHEA-S) na stężenie 17 β -estradiolu wyrażony współczynnikiem korelacji wielorakiej R wynosił 0,77. Największą siłę związku ze stężeniem 17 β -estradiolu wykazywało stężenie cholesterolu, dla którego wartość standaryzowanego współczynnika B wynosiła 2,57 w porównaniu ze stężeniem DHEA-S (0,41) i progesteronu (0,55). Wartość poprawionego $R^2 = 0,59$, zastosowane ze względu na występowanie korelacji między zmiennymi wskazała, że 59% zmienności 17 β -estradiolu była wyjaśniona przez zastosowany model.

UDZIAŁ CHOLESTEROLU, E2, PROGESTERONY ORAZ DHEA W POZIOMIE USZKODZEŃ DNA W LIMFOCYTACH CIĘŻARNYCH KOBIET – ANALIZA ŚCIEŻEK

Zarówno pozytywna jak i destrukcyjna rola RFT powstających podczas metabolizmu estrogenów jest mało do tej pory zbadana, a zatem pytanie o udział metabolitów pośrednich w powstawaniu uszkodzeń DNA podczas ciąży wydaje się zasadny.

Badania nad stabilnością genetyczną komórek kobiet w różnym okresie ciąży przeprowadzano w limfocytach. Materiał ten wybrano ponieważ odzwierciedla on historię ekspozycji organizmu na działanie czynników znajdujących się w krążeniu. W szczególności obecność odpowiednich receptorów w limfocytach pozwala sądzić, że są one dobrym materiałem do badań zmian w uszkodzeniach DNA w relacji z hormonami. Wybór limfocytów wynikał także z faktu, że wykazują one ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę 17 β -estradiolu, a także są w stanie syntetyzować progesteron, DHEA i androstenodion (Zhou 2002). Czas życia tych komórek i ekspozycja na czynniki krążące wraz z krwią sprawiają, że ich DNA stanowi doskonały biomarker poziomu uszkodzeń materiału genetycznego odzwierciedlający warunki środowiska zewnętrznego jak i wewnętrznego organizmu dawcy.

Chcąc uzyskać interpretację przyczynową związku pomiędzy stężeniami E2 (EST), progesteronu (PROG), cholesterolu (CHOL), DHEA a poziomem uszkodzeń DNA w limfocytach analizowanych metoda kometową, takich jak uszkodzenia alkali-labilne(K), uszkodzenia związane z utlenieniem zasad pirymidynowych (E) i zasad purynowych (F), a także uszkodzenia netto, czyli różnica pomiędzy poziomem uszkodzeń DNA uzyskanym po inkubacji z enzymem rozpoznającym utle-

nione zasady (endonukleaza III- zasady pirymidynowe; Fpg – zasady purynowe) i bez enzymu, czyli uszkodzeń alkali-labilnych (E-K i odpowiednio F-K) zastosowano analizę statystyczną zwaną analizą ścieżek (path analysis). Ta unikatowa metoda zakłada, że wariancja zmiennej endogenicznej (poziom uszkodzeń DNA, K, E-K, F-K) jest w całości wyjaśniana przez zmienne endogeniczne (EST, PROG, CHOL, DHEA), które – w przeciwieństwie do analizy regresji – mogą być ze sobą skorelowane przez nieskorelowany z nimi składnik losowy. Budowany jest diagram zależności przyczynowo-skutkowych obrazujący oddziaływania zmiennych egzogenicznych na zmienną endogeniczną i uwzględniający następstwa czasowe (przyczyna poprzedza skutek). Wyliczane w modelu współczynniki ścieżkowe umożliwiają dekompozycję korelacji, gdyż odpowiadają one wielkościom wpływów bezpośrednich. Zatem całkowita korelacja zmiennej endogenicznej i zmiennej egzogenicznej może być rozbita na wpływy bezpośrednie (równe korelacjom cząstkowym) i pośrednie, tzn. na oddziaływania zmiennej egzogenicznej przez pozostałe zmienne na wszystkich ścieżkach diagramu (Wright 1960).

W pracy posłużono się współczynnikami korelacji Pearsona, a współczynniki ścieżkowe obliczono ze wzoru: $[p_j] = R^{-1} \cdot r_{jv}$, gdzie R – jest macierzą korelacji zmiennych egzogenicznych, a r_{jv} – oznacza wektor korelacji zmiennych egzogenicznych ze zmienną endogeniczną. Bazując na powyższym równaniu możemy posłużyć się także innymi miarami współzależności cech ze znakiem (np. opartymi na statystyce Chi-kwadrat w sytuacji, gdy zmienne są wyrażone w słabych skalach, ale porządkowych) (Chrzanowska, Matusik 2006).

Analizując hierarchię wpływów, czyli udziały poszczególnych zmiennych egzogenicznych w wyjaśnianiu wariancji zmiennej endogenicznej, jako 100% przyjęto wyjaśnianą przez model wielkość wariancji, czyli wartość współczynnika determinacji R^2 .

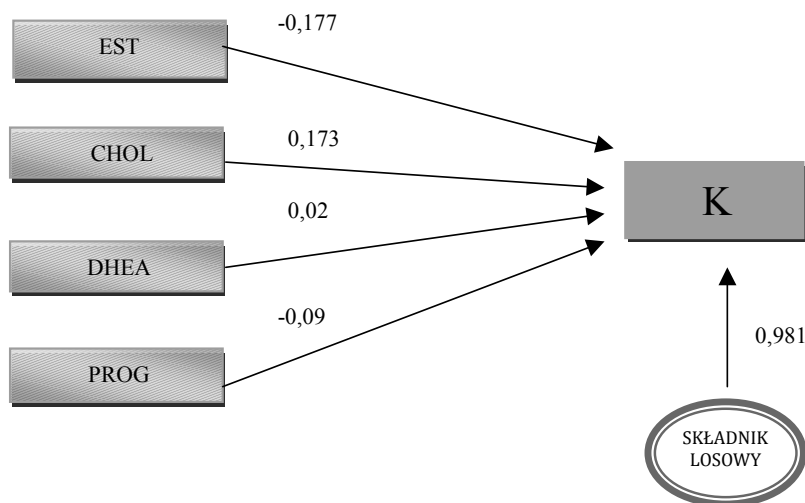
Metoda analizy ścieżkowej umożliwiła nie tylko na określenie siły wpływów zmiennych egzogenicznych na średni poziom uszkodzeń DNA, ale również na określenie proporcji tych oddziaływań w odniesieniu do standaryzowanych zmiennych. Ustalono także hierarchię wpływów metabolitów pośrednich (zmienne niezależne) na kolejno analizowane uszkodzenia DNA (zmienne endogeniczne). Dzięki zastosowaniu tej metody, możliwe też było uzyskanie wiedzy o sposobie tych oddziaływań, dzięki ich rozdzieleniu na oddziaływania bezpośrednie oraz pośrednie. Wyznaczona wielkość współczynnika korelacji cząstkowej pozwoliła na określenie oddziaływań bezpośrednich, a pozostałe zmienne pokazują wpływy pośrednie. Wpływy pośrednie na zmienną zależną realizowane są poprzez wzajemne skorelowanie zmiennych niezależnych między sobą. Uzyskane w ten sposób informacje, w postaci procentowych

udziałów oddziaływań pośrednich danej zmiennej egzogenicznej przez pozostałe zmienne niezależne, stały się dodatkowym źródłem do przeprowadzenia analiz statystycznych.

Należy zauważyć, że z powodu występowania powiązań między zmiennymi egzogenicznymi, wyjaśnianie całkowitej wariancji zmiennej zależnej w analizowanych modelach jest na ogół niewielkie, co objawia się relatywnie niską wartością współczynnika determinacji R^2 . Jednak zastosowanie np. metod regresyjnych prowadziłoby do uzyskania wyników niepoprawnych, z powodu niespełnienia założenia o niezależności zmiennych egzogenicznych lub uzyskania w wielu przypadkach modeli zawierających tylko wartość stałą, pomijających zmienne egzogeniczne.

Dla każdej ze zmiennych zależnych, czyli alkali-labilnych uszkodzeń DNA (K); sumy uszkodzeń alkali-labilnych i utlenionych zasad pirymidynowych (E) i pirymidynowych (F) oraz oksydacyjnych uszkodzeń netto: zasad pirymidynowych (E-K) i zasad purynowych (F-K), zbudowano diagram obrazujący model oddziaływań zmiennych niezależnych, którymi były 4 zmienne: stężenie 17β -estradiolu (EST) [pg/ml], cholesterolu (CHOL) [mM], DHEA [μ g/dl] i progesteronu (PROG) [ng/ml].

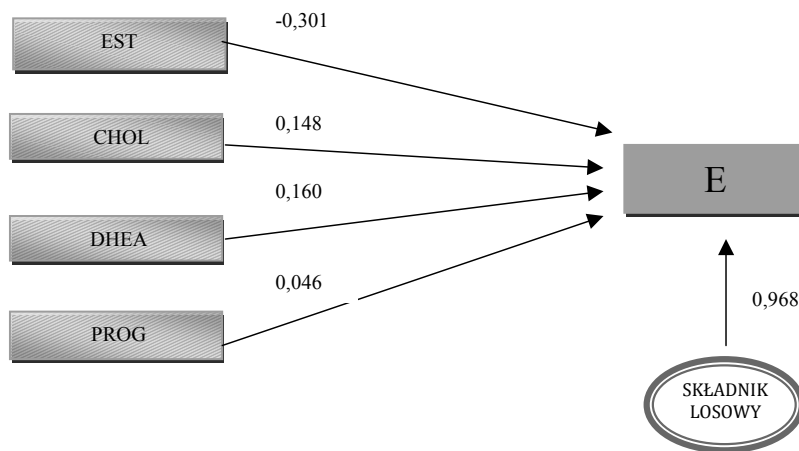
Poniżej przedstawiono model dla zmiennej K (Ryc. 4) wraz z oszacowanymi współczynnikami ścieżkowymi (wartości umieszczone nad strzałkami).



Rycina 4. Model ścieżkowy oddziaływań 17β -estradiolu (EST), cholesterolu (CHOL), DHEA i progesteronu (PROG) na poziom endogennych alkali-labilnych pęknięć w pojedynczych niciach DNA (K) w limfocytach ciężarnych kobiet.

Model ten wyjaśniał 3,8% zmienności. Największy udział w tej zmienności miał 17β -estradiol (EST) 60,3%, następnie progesteron (PROG) 26,3% oraz cholesterol (CHOL) 13,3%, natomiast wpływ DHEA był minimalny 0,15% i zmienną tą można usunąć z modelu. Oddziaływanie 17β -estradiolu i cholesterolu odbywało się bardziej w sposób bezpośredni (odpowiednio 54,3% i 54,6%), natomiast progesteron działał w tym modelu w 68,6% w sposób pośredni, głównie przez cholesterol i 17β -estradiol. Podobnie DHEA działało na K (poziom uszkodzeń alkali-labilnych) w 72,8% pośrednio, również poprzez 17β -estradiol i cholesterol.

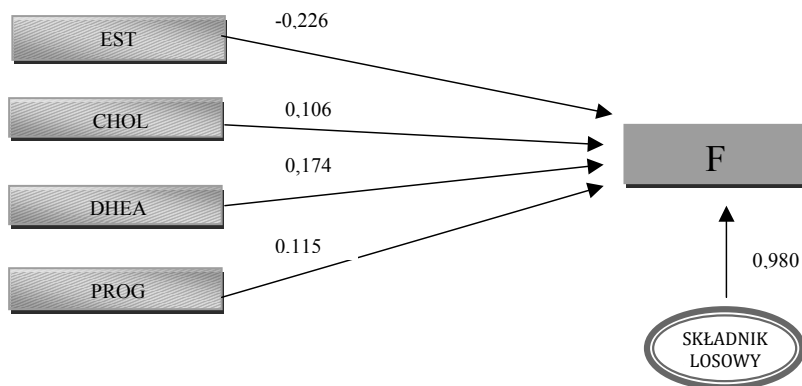
Kolejny model opisuje strukturę wpływów na zmienną E (Ryc. 5).



Rycina 5. Model ścieżkowy oddziaływań 17β -estradiolu (EST), cholesterolu (CHOL), DHEA i progesteronu (PROG) na poziom sumy endogennych alkali-labilnych i oksydacyjnych uszkodzeń zasad pirymidynowych w pojedynczych niciach DNA (E) w limfocytach ciężarnych kobiet.

Wyjaśniany poziom wariancji zmiennej E wynosi 6,4%, w czym estradiol miał udział ponad 2/3 (67,6%), zaś DHEA – ponad 1/5 (21,5%). Udział cholesterolu i progesteronu kształtował się na poziomie około 5% (odpowiednio 5,4% i 5,5%). DHEA wpływało na E w 76% w sposób bezpośredni, a estradiol w 72%. Oddziaływanie cholesterolu w 58,9% odbywało się w sposób pośredni (głównie przez estrogen), natomiast progesteron działał na E w 86% pośrednio, w większości przez 17β -estradiol.

Na Ryc. 6. przedstawiono model oddziaływania analizowanych zmiennych na F.



Rycina 6. Model ścieżkowy oddziaływań 17β-estrogenu (EST), cholesterolu (CHOL), DHEA i progesteronu (PROG) na sumę endogennych uszkodzeń alkali-labilnych i oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych (F).

Wyjaśniany poziom wariancji zmiennej F wynosi 4%, przy niemal identycznym udziale zmiennych DHEA (48,9%) i 17β-estradiolu (48,7%). Można w tym modelu pominąć wpływ cholesterolu (0,2%), natomiast progesteron, wyjaśniający 2,2% zmienności F działał głównie pośrednio przez estradiol, a w mniejszej części przez cholesterol i DHEA. Ten ostatni związek oddziaływał na F bezpośrednio w 75,8%, a 17β-estradiolem w 62,3%.

PODSUMOWANIE:

We wszystkich analizowanych zależnościach obserwowano negatywną zależność pomiędzy 17β-estradiolem a uszkodzeniami DNA, co wskazuje na ochronne działanie tego hormonu. Jest to o tyle interesujące, że dane epidemiologiczne wskazują, że wczesna ciąża (poniżej 20 roku życia) obniża ryzyko zachorowania na nowotwory piersi (Baeyens 2005). Sądzi się, że wczesne zróżnicowanie komórek nabłonkowych kanalików mlecznych, czyni je mniej wrażliwymi na późniejszą ekspozycję na czynniki sprzyjające transformacji nowotworowej (Mitrunen, Hirvonen 2003). Na modelach zwierzęcych, pokazano, że krótkotrwała ekspozycja na fizjologiczne dawki progesteronu i 17β-estradiolu podnosi stabilność genetyczną komórek gruczołu sutkowego, natomiast hormony te podawane oddzielnie, nie wywołują efektu ochronnego

(Tu 2005). Niedobór estrogenów spowodowany usunięciem jajników wiąże się z indukacją stresu oksydacyjnego w wielu tkankach zwierząt laboratoryjnych. Stwierdzono, iż podanie 17β -estradiolu i/lub katecholowych estrogenów (2- i 4-hydroksyestradiol) przeciwdziała skutkom stresu tlenowego w erytrocytach i osoczu po resekcji jajników, również po podaniu toksyn indukujących stres oksydacyjny (Munoz-Castaneda 2006). Wykazano ochronne działanie 17β -estradiolu przeciw skutkom stresu tlenowego na stabilność genetyczną komórek siatkówki poprzez oddziaływanie na drodze pozagenomowej (Bucolo, Drago 2007). Stwierdzono ponadto, iż 17β -estradiol administrowany *in vitro* chroni neurony myszy przed uszkadzającym wpływem H_2O_2 (Cao 2003). 17β -estradiolu chroni LDL przed utlenieniem i cytotoksycznym wpływem utlenionych LDL na komórki łożyska w odróżnieniu od progesteronu, który, jak stwierdzono, promuje te efekty (Zhu 1997).

W czasie ciąży to prawdopodobnie estrogeny, jako jedyne steroidy, pełnią funkcję przeciwtleniającą (Reyes 2006), jednak doniesienia z zastosowaniem bardzo wysokich stężeń 17β -estradiolu ($10 \mu M$) *in vitro* wymagały weryfikacji w badaniach *in vivo*. Wszystkie te obserwacje wskazują, że metabolizm hormonów płciowych ogrywa istotną rolę w poziomie stresu oksydacyjnego w organizmie. Zwłaszcza jest to istotne w okresie ciąży. Status estrogenowy w czasie ciąży wpływa zarówno na organizm płodu jak i organizm matki. Podczas metabolizmu 17β -estradiolu są bowiem generowane wolne rodniki i reaktywne formy tlenu zdolne do uszkadzania struktur komórkowych oraz materiału genetycznego czyniąc z 17β -estradiolu czynnik potencjalnie cancerogenny. Potwierdzają to eksperymenty prowadzone *in vitro* a także badania epidemiologiczne (Kobiela 2007, Yager 2000). Największą rolę w kancerogenezie odgrywają zdolności 17β -estradiolu do stymulacji proliferacji komórek, ponieważ podczas podziałów dochodzi do utrwalania uszkodzeń w postaci mutacji wywołanych działaniem katecholowych pochodnych estradiolu (Roy 2007).

Zaobserwowana ochronna rola estrogenu na DNA limfocytów, wyrażona ujemną korelacją pomiędzy stężeniem 17β -estradiolu, zdaje się wynikać nie tylko z ich własności antyoksydacyjnych, ale także z roli, jaką odgrywa on we wczesnym różnicowaniu komórek gruczołów piersiowych, czy zablokowania proliferacji tych komórek przez indukację ekspresji p53 (Sivaraman 2001). Ta zdolność do zmiatania wolnych rodników najlepiej ilustruje zahamowanie procesów peroksydacji lipidów w obecności estrogenów, co wydaje się mieć szczególne znaczenie dla rozwijającego się centralnego układu nerwowego płodu (Reyes 2006). Jest to o tyle istotne, że w okresie ciąży, stanie fizjologicznym o dużym zapotrzebowaniu metabolicznym, indukowany jest stres oksydacyjny.

Równowaga oksydacyjna wydaje się być zapewniona dzięki silnym właściwościom przeciwutleniającym estrogenu.

Ochronna rola estrogenu wyjaśniania jest także przez wyniki badań wskazujące, że podniesienie stężenia estrogenów powoduje wzrost antyoksydacyjnej siły osocza (Delibasi 2006). Te przeciwutleniające właściwości 17β -estradiolu i progesteronu w osoczu zostały także potwierdzone przez wielu innych autorów (Widyarini 2006, Reyes 2006).

LITERATURA:

- Arslan, A.A., et al., Effects of parity on pregnancy hormonal profiles across ethnic groups with a diverse incidence of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006. 15(11): p. 2123-30
- Aurousseau, B., D. Gruffat, and D. Durand, Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reprod Nutr Dev*, 2006. 46(6): p. 601-20.
- Baeyens, A., et al., Effects of estradiol and progesterone on the variability of the micronucleus assay. *Mutat Res*, 2005. 578(1-2): p. 308-16.
- Baik, I., et al., Association of fetal hormone levels with stem cell potential: evidence for early life roots of human cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(1): p. 358-63.
- Brosens, J.J. and B. Gellersen, Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol*, 2006. 36(3): p. 389-98.
- Bucolo, C. and F. Drago, Neuroactive steroids protect retinal tissue through sigma1 receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007. 100(3): p. 214-6.
- Cao, W., et al., Neuroprotective effect of estrogen upon retinal neurons in vitro. *Adv Exp Med Biol*, 2003. 533: p. 395-402.
- Chrzanowska M., Matusik S. (2006), Male Inhabitants of Krakow and their Self-assessment of Health Condition in the Light of some of Selected Biological Traits, Social Variables, and Lifestyles, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 15, No 2B, Part IV: 1034-1037.
- Delibasi, T., et al., Antioxidant effects of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Swiss Med Wkly*, 2006. 136(31-32): p. 510-4.
- Khalil, A., et al., Age-related decrease of dehydroepiandrosterone concentrations in low density lipoproteins and its role in the susceptibility of low density lipoproteins to lipid peroxidation. *J Lipid Res*, 2000. 41(10): p. 1552-61.
- Kobiela, J., et al., Dynamics of estrogen-induced oxidative stress. *Acta Biochim Pol*, 2007. 54(2): p. 289-95.

- Kristensen, V.N., et al., Gene expression profiling of breast cancer in relation to estrogen receptor status and estrogen-metabolizing enzymes: clinical implications. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(2 Pt 2): p. 878s-83s.
- Labrie, F., Luu-The, V., Bélanger, A., Lin, S-X., Simard, J., Pelletier, G. and a.C. Labrie, Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of Endocrinology*, 2005. 187: p. 169-196.
- Milczarek, R., et al., The NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental microsomes. *Mol Cell Biochem*, 2007. 295(1-2): p. 105-11.
- Mitrunen, K. and A. Hirvonen, Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res*, 2003. 544(1): p. 9-41.
- Munoz-Castaneda, J.R., et al., Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. *Toxicol Lett*, 2006. 160(3): p. 196-203.
- Olinski, R., et al., Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol*, 2007. 54(1): p. 11-26.
- Pasqualini, J.R., Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. 97(5): p. 401-15.
- Pepe, G.J. and E.D. Albrecht, Central integrative role of oestrogen in the regulation of placental steroidogenic maturation and the development of the fetal pituitary-adrenocortical axis in the baboon. *Hum Reprod Update*, 1998. 4(4): p. 406-19.
- Reyes, M.R., A. Sifuentes-Alvarez, and B. Lazalde, Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2006. 85(9): p. 1090-3.
- Roy, D., et al., Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2007. 10(4): p. 235-57.
- Seino, T., et al., Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*, 2002. 77(6): p. 1184-90.
- Sivaraman, L., et al., p53 is a potential mediator of pregnancy and hormone-induced resistance to mammary carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(22): p. 12379-84.
- Szeto, Y.T., W.K. Chu, and I.F. Benzie, Antioxidants in fruits and vegetables: a study of cellular availability and direct effects on human DNA. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006. 70(10): p. 2551-5.

- Troisi, R., et al., Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. 12(5): p. 452-6.
- Tu, Y., et al., Sensitivity to DNA damage is a common component of hormone-based strategies for protection of the mammary gland. *Mol Cancer Res*, 2005. 3(8): p. 435-42.
- Tunez, I., M.C. Munoz, and P. Montilla, Treatment with dehydroepiandrosterone prevents oxidative stress induced by 3-nitropropionic acid in synaptosomes. *Pharmacology*, 2005. 74(3): p. 113-8.
- Widyarini, S., et al., Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(34): p. 12837-42.
- Wright S., 1960, Path Coefficients and Path Regressions: Alternative or Complementary Concepts?, *Biometrics* 16, June 1960, 189-202.
- Yager, J.D., Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2000(27): p. 67-73.
- Zhou, Q., et al., Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl*, 2002. 23(6): p. 870-81.
- Zhu, X.D., B. Bonet, and R.H. Knopp, 17beta-Estradiol, progesterone, and testosterone inversely modulate low-density lipoprotein oxidation and cytotoxicity in cultured placental trophoblast and macrophages. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. 177(1): p. 196-209.

ZAŁĄCZNIK 5C.

NIEDOBORY FOLIANÓW W DIECIE I ICH WPŁYW NA STABILNOŚĆ GENETYCZNĄ¹

Małgorzata Kalemba-Drożdż²

STRESZCZENIE:

Foliany uczestniczą w wielu reakcjach biochemicznych w naszych komórkach. Ich obecność warunkuje m.in. prawidłowy przebieg replikacji, naprawy oraz metylacji DNA, a także procesów detoksyfikacji. Niedobory kwasu foliowego oprócz zagrożenia niedorozwojem płodu u kobiet ciężarnych i chorobami układu krążenia u osób dojrziałych niosą ze sobą ryzyko utraty stabilności genetycznej i podnoszą ryzyko chorób nowotworowych. W badanej populacji Małopolski dietetyczne niedobory folianów dotyczą 90% osób.

Słowa kluczowe: kwas foliowy, MTHFR, stabilność genetyczna, uszkodzenia DNA, niedobory dietetyczne

ABSTRACT:

Folates take part in many major biochemical processes in human cells including: replication, DNA repair, DNA methylation and detoxification processes. Folic acid deficiency in diet increases the risk of neural tube defect in fetus, cardiovascular disease in adults and furthermore the loss of genetic stability and, as the consequence, neoplastic diseases. The dietary deficiency of folic acid affects more than 90% of population in Malopolska Province.

Key words: folic acid, MTHFR, genetic stability, DNA damage, nutrition allowances

Zmiany w materiale genetycznym wynikające z niedoborów dietetycznych mogą przypominać uszkodzenia powodowane przez promieniowanie jonizujące: pojedynczo- i podwójnoniciowe pęknięcia DNA

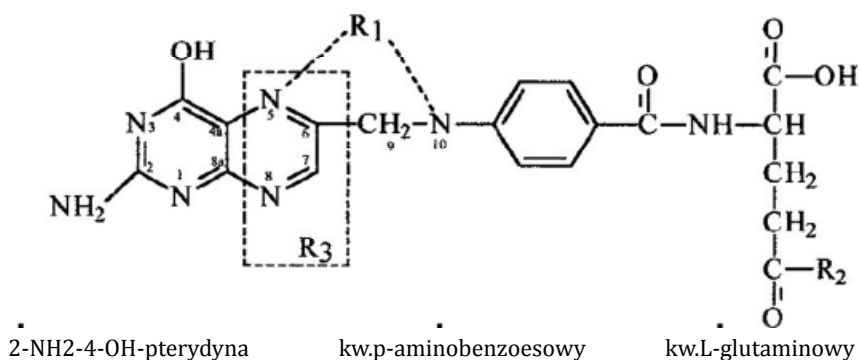
¹ Niniejszy maszynopis został opublikowany jako: Małgorzata Kalemba-Drożdż. „Niedobory folianów w diecie i ich wpływ na stabilność genetyczną”. – [w:] Interdyscyplinarne aspekty nauk o zdrowiu. OFICYNA WYDAWNICZA AFM, Kraków 2011, s. 21-32.

² Dr, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych.

oraz modyfikacje oksydacyjne zasad azotowych. Stwierdzono, że niedobory niektórych składników jak: witamina C, witamina A, witamina E, cynk i żelazo prowadzą do zwiększenia ilości oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Podobnie nie zrealizowanie dziennego zapotrzebowania na kwas foliowy, prowadzi do zmniejszenia stabilności genetycznej przez wzrost poziomu błędnie wbudowanego uracylu, zmianę stopnia metylacji i pęknięcia chromosomów [1-6]. Poziom uszkodzeń DNA zależy zarówno od ich bezpośredniej indukcji, jak i od wydajności usuwania hydroksylowych metabolitów pośrednich zwykle w procesach sprzęgania z niskocząsteczkowymi związkami takimi jak glutation czy grupy metylowe. Niedobory tych ostatnich są związane z niewystarczającą ilością spożywanego kwasu foliowego i/lub z niską aktywnością enzymu, reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu (MTHFR). Aktywność tego enzymu determinowana jest polimorfizmem kodującego go genu.

Pochodne kwasu foliowego – foliany, uczestniczą w wielu reakcjach biochemicznych w komórkach. Foliany są głównym przenośnikiem grup jednowęglowych o różnym stopniu utlenienia, przez co mogą uczestniczyć w szeregu różnorodnych reakcji enzymatycznych. Są niezbędne wszystkim komórkom organizmu, jednak ich niedobory najszybciej ujawniają się w pogorszeniu kondycji nabłonków, w układzie krwiotwórczym w postaci niedokrwistości oraz w układzie nerwowym. Wchłanianie kwasu foliowego z układu pokarmowego jest silnie zaburzone przez alkohol, nikotynę, środki antykoncepcyjne i niektóre leki.

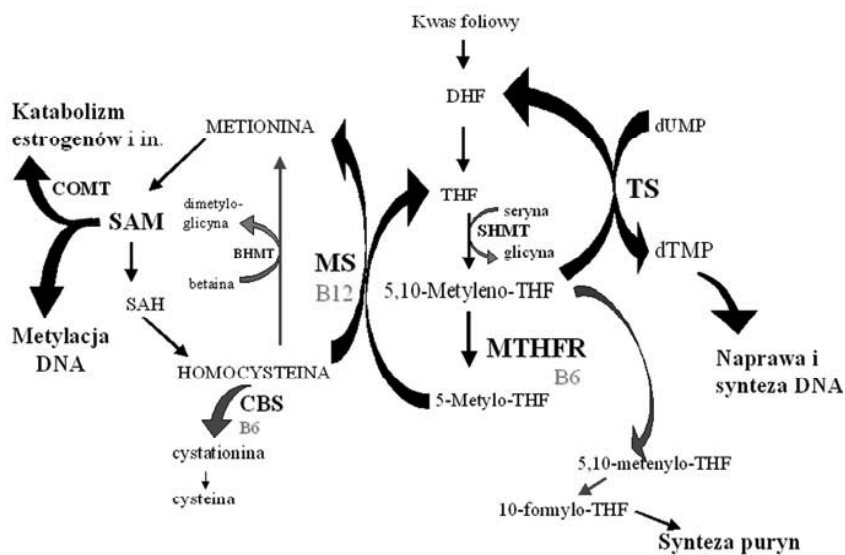
Podstawową postacią koenzymatyczną kwasu foliowego jest jego zredukowana forma: tetrahydrofolian (THF) (Rycina 1).



Rycina 1. Wzór chemiczny kwasu foliowego.

Dzięki występowaniu na różnych stopniach utlenienia THF może przenosić grupy: metylowe, metylenowe, metenylowe, formylowe, formiminowe. Bierze więc udział w przemianach szeregu aminokwasów

(seryny, glicyny, histydyny), resyntezie metioniny i biosyntezie zasad purynowych i pirymidynowych - prekursorów DNA i RNA. Głównie źródło pokarmowe kwasu foliowego stanowią warzywa, przede wszystkim te zielone, owoce, produkty pełnoziarniste, a także mięso i wątroba. W pewnym stopniu kwas foliowy jest również syntetyzowany przez endogenną florę jelitową. Obróbka termiczna powoduje straty od 50% do 90%, jest to witamina wrażliwa na UV i utlenianie. Wchłanianie w jelicie wynosi od 50 do 90%. Pod wpływem enzymów jelitowych poliglutaminowe pochodne kwasu foliowego zostają rozszczepione do monoglutamylofolianów i w takiej postaci są absorbowane do układu krwionośnego. Kwas foliowy jest redukowany do dihydrofolianu (DHF), a następnie redukowany przez reduktazę dihydrofolianową (DHFR) do tetrahydrofolianu (THF). Rycina 2 przedstawia uproszczony schemat reakcji metabolicznych związanych ze stabilnością genetyczną, w których uczestniczą foliany.



Rycina 2. Schemat szlaków metabolicznych z udziałem kwasu foliowego.

BHMT – S-metylotransferaza betaina-homocysteina, CBS – syntaza cystationinowa, COMT – O-metyltransferaza katecholowa, DHF – dihydrofolian, MS – syntaza metioninowa, której kofaktorem jest witamina B12, MTHFR – reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianu, której kofaktorem jest witamina B6, SAM – S-adenozylometionina, donor grup metylowych dla COMT, SHMT – hydroksymetylotransferaza serynowa, THF – tetrahydrofolian, TS – syntaza tymidylanowa.

Niedobory folianów mogą wpływać na stabilność genetyczną komórek ponieważ foliany biorą udział w produkcji *de novo* puryn oraz syntezie tymidyny. Do syntezy puryn niezbędne są 5,10-metylenoTHF oraz 10-formyloTHF. W wyniku utlenienia 5,10-metylenoTHF do 5,10-meteniloTHF, a następnie przekształcenia go, powstaje 10-formyloTHF, ten zaś może odwracalnie być izomeryzowany do 5-formyloTHF.

5,10-metylenoTHF służy jako donor grup metylowych do syntezy tymidyny z mononukleotydu urydynowego, za co odpowiada syntaza tymidylanowa. W trakcie reakcji metylacji monofosforanu deoksyurydyny do monofosforanu deoksytymidyny, tetrahydrofolian zostaje utleniony do dihydrofolianu (DHF), który następnie może być redukowany do THF w reakcji katalizowanej przez reduktazę dihydrofolianu (DHFR). Niedobory kwasu foliowego prowadzą do zmniejszenia się puli tyminy niezbędnej do polimeryzacji i naprawy DNA. W takim przypadku może dojść do błędnego wbudowywania uracylu w miejsce tyminy do DNA. Obecność uracylu w DNA jest także wynikiem spontanicznej deaminacji deoksycytozyny. Takie zaburzenie ma wysoki potencjał mutagenny, ponieważ naprzeciwko uracylu wbudowywana jest preferencyjnie adenina, co w trakcie replikacji może prowadzić do zmiany pary zasad GC na AT w potomnej cząsteczce DNA. W ludzkim materiale genetycznym codziennie pojawia się średnio kilkaset cząsteczek uracylu, zaś w przypadku niedoborów kwasu foliowego ta liczba wzrasta do 4 milionów.

Błędnie wbudowany nukleotyd urydylowy jest specyficznie wycinany przez glikozylazę uracylową (UDG). Luki w DNA są uzupełniane przez polimerazę DNA, a końce nici łączone przez ligazę. Jeżeli w trakcie procesów naprawczych nadal panuje deficyt folianów, a co za tym idzie nukleotydów tymidynowych, komórce grozi całkowita destabilizacja genetyczna ponieważ mogą wtedy powstać podwójnoniciowe pęknięcia DNA i aberracje chromosomowe.

Tak silne zaburzenia integralności genomu mogą prowadzić do kancerogenezy. Wykazano, iż limfocyty *in vitro* hodowane w pożywce pozbawionej kwasu foliowego charakteryzuje znacznie obniżona zdolność naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA indukowanych nadtlenkiem wodoru w porównaniu do komórek hodowanymi w pożywce bogatej w foliany [7]. Natomiast nasze badania wskazują, że poziom błędnie wbudowanego uracylu do DNA limfocytów kobiet w wieku reprodukcyjnym ulega obniżeniu pod wpływem suplementacji diety 400 µg kwasu foliowego dziennie. Ponadto stwierdzono, że po 4-tygodniowej suplementacji diety o 400 µg kwasu foliowego dziennie obniżeniu ulega również poziom uszkodzeń oksydacyjnych [5, 6]. Dane te potwierdzają doniesienia, iż niedobory folianów w organizmie są związane ze wzrostem ryzyka nowotworów płuc, piersi, przełyku, mózgu i jelita grubego [1, 8].

Jednocześnie kwas foliowy odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu właściwego poziomu metylacji genomu, co również przekłada się na stabilność genetyczną komórki. 5,10-metylenoTHF (N^5,N^{10} -metylenotetrahydrofolian) ulega redukcji pod wpływem reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) do 5-metyloTHF (N^5 -metylotetrahydrofolian), którego stężenie mierzone jest w surowicy krwi. MTHFR jest enzymem limitującym cykl aktywnego metylu. 5-metyloTHF służy jako donor grupy metylowej w reakcji remetylacji homocysteiny do metioniny. Kofaktorem syntazy metioninowej jest witamina B12. Metionina natomiast jest prekursorem S-adenozylometioniny (SAM). SAM jest swoistym buforem grup metylowych. SAM uczestniczy w licznych reakcjach jako ich donor, między innymi w procesie metylacji DNA oraz inaktywacji związków aromatycznych w II fazie detoksyfikacji. Niewystarczające stężenie SAM prowadzi do hipometylacji DNA istotnej dla utrzymania homeostazy komórkowej [9-11]. Po przeniesieniu grupy metylowej z SAM na substrat powstaje S-adenozylhomocysteina (SAH), która następnie ulega hydrolizie do adenozyiny i homocysteiny. Niedostateczna podaż folianów oraz witaminy B12 skutkuje obniżeniem stężenia S-adenozylometioniny.

Homocysteina może stanowić pośredni substrat do syntezy cysteiny przez syntazę cystationiny zależną od witaminy B6, gdzie donorem grupy metylowej jest betaina [12]. Odpowiednia ilość 5-metyloTHF zapobiega nagromadzeniu homocysteiny i odnawianiu puli metioniny. Odkładanie się homocysteiny jest czynnikiem patogennym (homocysteinemia) w chorobach związanym z układem krążenia i niedorozwojem umysłowym [12].

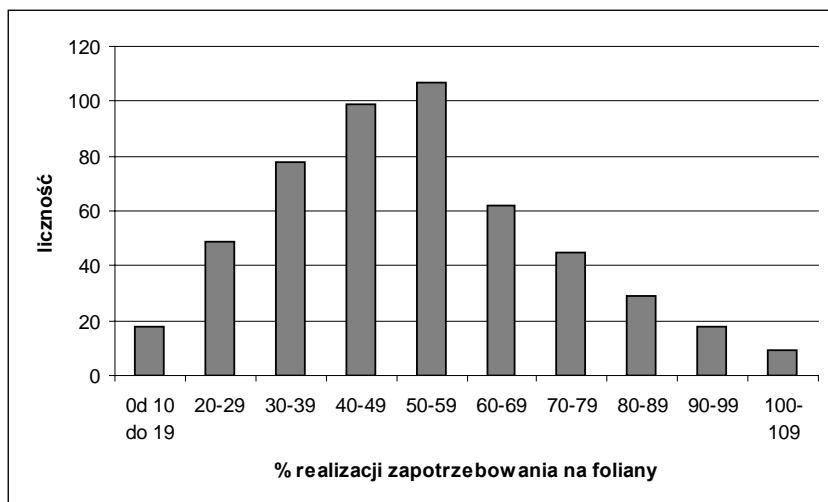
Do hipometylacji genomowej może dojść w efekcie niedoboru kwasu foliowego, a także w wyniku deficytu witaminy B12. Metylacja specyficznych cytozyn w sekwencji DNA odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów. Około 4% cytozyn w DNA komórek ssaków jest w formie zmetylowanej. Występują one najczęściej w sekwencjach palindromowych oraz w dwójkach nukleotydowych C^mG . Zmiany poziomu metylacji w obrębie regionów promotorowych stanowią ważny czynnik kontroli transkrypcji genów mogące prowadzić do supresji transkrypcji. Hipometylacja może potencjalnie indukować proto-onkogeny prowadząc do promocji procesów nowotworowych. Natomiast hipermetylacja regionów promotorowych genów supresorowych może prowadzić do ich inaktywacji powodując destabilizację procesów komórkowych.

Badanie poziomu metylacji DNA oraz wzorca metylacji wybranych genów stanowią dobry sposób oceny inicjacji kancerogenezy. Badania nad nowotworami piersi, prostaty, macicy, okrężnicy i tarczycy sugerują, że pojawienie się mutacji jest konsekwencją wcześniejszej hipometylacji [1, 2, 7, 13-15]. U osób poddanych długoterminowej diecie ubogiej

w kwas foliowy wykazano występowanie hipometylacji w DNA limfocytów izolowanych z krwi obwodowej. Po przywróceniu prawidłowo zbilansowanej diety o odpowiedniej ilości folianów metylacja wracała do poziomu wyjściowego [1, 2].

Kwas foliowy jest czynnikiem niezwykle istotnym w czasie ciąży. Jego niedobory ograniczają wzrost i tempo podziałów komórkowych, co może prowadzić do poważnego niedorozwoju płodu, schorzeń mięśnia sercowego, zaburzenia rozwoju układu nerwowego. Najlepiej poznany objaw chorobowy, jaki niedobory folianów mogą wywierać na rozwój płodu, jest rozszczepienie cewy nerwowej u niemowląt [16]. Deficyt folianów wpływa również na przedwczesny poród oraz niską wagę urodzeniową niemowląt, co jest prawdopodobnie spowodowane niedorozwojem łożyska [17]. W czasie ciąży foliany z krwiobiegu matki są wychwytywane przez receptory folianowe komórek kosmówki, a następnie zgodnie z malejącym gradientem stężeń są przekazywane do krążenia płodu.

Zakłada się, że zalecane dzienne spożycie kwasu foliowego wynosi 270 μg , przy czym zapotrzebowanie na foliany rośnie u osób starszych, spożywających nawet nieznaczne ilości alkoholu, nadużywających kąpieli słonecznych oraz kobiet przyjmujących środki antykoncepcyjne. Natomiast dla kobiet ciężarnych wartość zapotrzebowania dietetycznego na foliany kształtuje się na poziomie 400 μg dziennie. Za deficyt folianów uznaje się stan, gdy ich stężenie w erytrocytach jest niższe niż 140 ng/ml, oraz mniejsze niż 6 ng/ml w surowicy [18].



Rycina 3. Spożycie kwasu foliowego w diecie kobiet z Małopolski n=512 (bez suplementacji).

Stosując metodę analizy kwestionariuszy żywieniowych, stwierdzono, iż u 90% kobiet zarówno w ciąży jak i kobiet nieciężarnych z województwa małopolskiego występują niedobory kwasu foliowego w diecie, zaś u ponad połowy ankietowanych, realizacja zapotrzebowania na kwas foliowy nie osiągnęła nawet połowy rekomendowanego poziomu (Rycina 3). Zalecana suplementacja 400 µg kwasu foliowego dziennie przez 4 tygodnie u kobiet w wieku rozrodczym oraz przez cały okres ciąży u kobiet ciężarnych spowodowała, iż w surowicy stężenie folianów nie spadło poniżej 13 ng/ml.

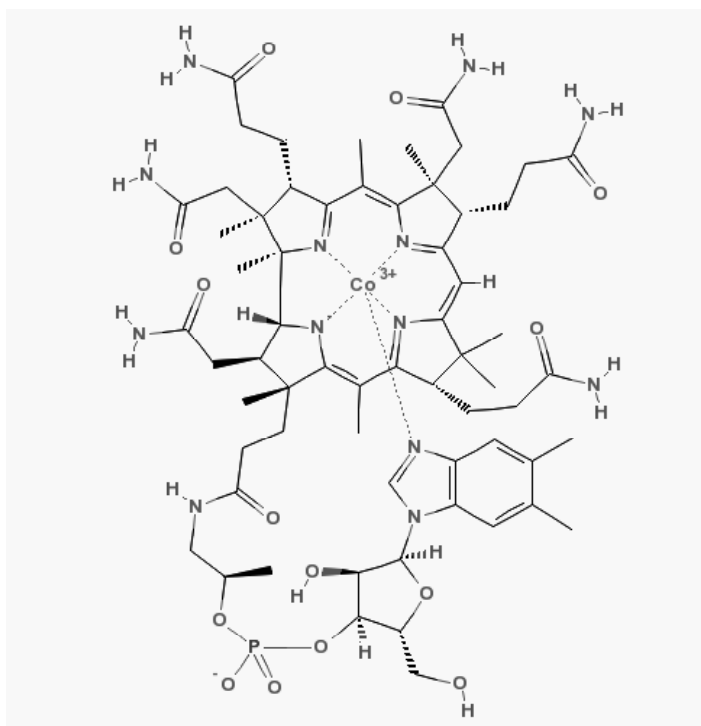
Pomimo iż niniejsze badanie koncentrowało się wyłącznie na kobietach, na podstawie danych socjologicznych można wnioskować, iż kwestia niedoborów dietetycznych kwasu foliowego dotyczy w takim samym lub nawet większym stopniu również mężczyzn [34].

Głównym folianem, którego stężenie oznacza się w surowicy jest 5-metyloTHF [19]. Ustalono, że aby utrzymać stabilność genetyczną komórek rozumianą jako: zapobieganie hipometylacji, zapobiegania błędnemu wbudowywaniu uracylu do DNA, wprowadzaniu pęknięć pojedynczo- i podwójnoniciowych DNA oraz aberracji chromosomowych, wymagane jest średnie stężenie folianów w surowicy powyżej 21 ng/ml, oraz powyżej 464 ng/ml w erytrocytach [4, 20]. Według niektórych badań optymalny poziom kwasu foliowego w surowicy warunkujący utrzymanie stabilności genetycznej powinien przekraczać 13 ng/ml lub 313 ng/ml folianów w krwinkach czerwonych [2, 18]. Erytrocyty stanowią główny rezerwuar kwasu foliowego. Krótkotrwałe niedobory folianów w diecie nie są w stanie zakłócić metabolizmu tego związku, dopiero długotrwały deficyt może naruszyć magazynowane rezerwy [21]. Dane epidemiologiczne pochodzące z Irlandii i USA, dowodzą, że deficyt kwasu foliowego jest najczęściej występującym niedoborem spośród wszystkich witamin [21-27]. Należy wspomnieć, iż dietę ubogą w foliany często też charakteryzuje deficyt witamin przeciwutleniających. Stąd w konsekwencji obniżony status antyoksydacyjny z jednoczesnym niedoborem kwasu foliowego stanowi czynnik ryzyka w promowaniu niestabilności genetycznej [3, 18, 20, 28-30]. Potwierdzono, iż dieta suplementowana kwasem foliowym przez 4 tygodnie, sprzyja redukcji ilości endogennych uszkodzeń oksydacyjnych DNA w limfocytach izolowanych z krwi obwodowej kobiet w wieku rozrodczym [5].

Wysokie spożycie kwasu foliowego nie jest jednak jedynym warunkiem stabilności genetycznej. Niedobory witaminy B12 – kofaktora syntazy metioninowej prowadzić mogą do tzw.: „pułapki folianowej”, czyli gromadzenia się 5-metyloTHF wobec niemożności wykorzystania go w reakcji metylacji homocysteiny do metioniny. Brak regeneracji 5-metyloTHF do tetrahydrofolianu prowadzi do obniżenia poziomu

5,10-metylenoTHF stanowiącego donor grupy metylowej dla syntazy tymidylanowej i wzrostu poziomu błędnie wbudowanego uracylu do DNA [3, 4, 6, 12, 28].

Zazwyczaj deficytem witaminy B12 określa się stan, gdy jej stężenie w surowicy jest niższe niż 150 pg/ml. Źródłem pokarmowym kobalaminy jest wyłącznie pokarm pochodzenia zwierzęcego, szczególnie mięso i wątroba. Niedobory w związku z tym dotyczą przede wszystkim wegan oraz osób z niedoborem czynnika Castle'a, niezbędnego do wchłaniania tej witaminy, co często występuje u osób starszych. Witamina B12 w organizmie ludzkim jest kofaktorem tylko dwóch enzymów: syntazy metionowej i mutazy metylomalonylo-CoA, która katalizuje zależną od adenozylokobalaminy izomeryzację L-metylomalonylo-CoA do bursztynylo-CoA. Koenzym B12 stanowi źródło wolnych rodników niezbędnych do przebiegu tych reakcji, polegających na zmianie dwóch grup pomiędzy atomami węgla substratów.



Rycina 4. Wzór chemiczny witaminy B12.

Badania z zastosowaniem metody mikrojąder wykazują, że poziom witaminy B12 we krwi zapobiegający niestabilności genetycznej powinien przekraczać 200 pg/ml [2, 31]. Natomiast zastosowanie znacznie

czulszej metody kometowej do badania uszkodzeń DNA w limfocytach pokazało jednak, że stężenie witaminy B12 nie powinno być niższe niż 400 pg/ml [6].

Deficyt kwasu foliowego w pożywieniu ma szczególne znaczenie dla ilości błędnie wbudowanego uracylu do DNA u osób, u których aktywność reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR) (EC 1.5.1.20) kodowanej przez polimorficzny gen MTHFR jest niska. Gen MTHFR znajduje się na chromosomie 1p36.3 i składa się z 11 eksonów. Występują w nim dwa dobrze opisane miejsca zmienności pojedynczych nukleotydów. W obrębie eksonu 4 kodującego domenę katalityczną MTHFR występuje tranzycja cytozyny na tyminę w pozycji 677 w 222 kodonie powodując zastąpienie alaniny waliną w białku. Zmiana ta skutkuje powstaniem enzymu o niższej aktywności katalitycznej oraz o niższej stabilności cieplnej w warunkach *in vitro* [32]. Polimorfizm ten determinuje wystąpienie trzech grup fenotypowych. Heterozygotyczność MTHFR w pozycji 677 CT powoduje, że mierzona aktywność reduktazy metylenotetrahydrofolianu spada do 60% w stosunku do homozygoty dzikiego typu CC, natomiast homozygoty TT wykazują aktywność zredukowaną do około 30%. Choć polimorfizmy występujące w pozycjach 677 i 1298 MTHFR (ekson 4 i 7) mogą mieć przeciwstawny wpływ fenotypowy na stężenie kwasu foliowego we krwi, to obydwa są związane z redukcją ryzyka kancerogenezy [33]. Niska konwersja 5,10-metylenoTHF w 5-metyloTHF zabezpiecza pulę substratu dla syntazy tymidylanowej, natomiast przesunięcie równowagi w kierunku 5-metyloTHF zwiększa jego pulę niezbędną dla procesów naprawczych i detoksyfikacyjnych, którym sprzyja wysoka podaż grup metylowych. Wysokie stężenie metioniny i SAM – inhibitorów enzymu MTHFR oraz niski poziom ko-faktora dinukleotydu flawinowo-adeninowego (FAD) spowodowanego np.: niedoborami ryboflawiny (witaminy B2) będącej prekursorem FAD, zmniejszają aktywność MTHFR.

Ze względu na istotną rolę folianów w utrzymaniu stabilności genetycznej komórek oraz fakt, iż jego niedobory dotyczą ponad 90% populacji Małopolski, będącej dobrym reprezentantem całego kraju, wskazane jest podjęcie działań edukacyjnych w społeczeństwie w celu zwiększenia świadomości zdrowotnej i promocji prawidłowej, bogatej w kwas foliowy diety. Obowiązkowa suplementacja kwasem foliowym diety kobiet ciężarnych wydaje się, przy obecnym stanie rzeczy, słusznym zaleceniem. Natomiast ze względu na niezmiennie ważne funkcje kwasu foliowego pełnione w naszym organizmie niezależnie od wieku i płci przede wszystkim istnieje konieczność kształtowania właściwych nawyków i wyborów żywieniowych w całym naszym społeczeństwie, a zwłaszcza wśród osób młodych.

Podziękowania składam na ręce kierownika badań Prof. dr hab. Marii Kapiszewskiej oraz doktora Tomasza Milewicz.

LITERATURA:

1. Duthie, S.J., et al., *Impact of folate deficiency on DNA stability*. J Nutr, 2002. 132(8 Suppl): p. 2444S-2449S.
2. Fenech, M., *The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells*. Mutat Res, 2001. 475(1-2): p. 57-67.
3. Fenech, M., *Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs)*. Food Chem Toxicol, 2002. 40(8): p. 1113-7.
4. Kalembe Małgorzata, et al., *The increased amount of vitamin B12 in serum is needed to minimize the uracil misincorporation into DNA during folate supplementation*. Trends in Food Science & Technology, 2005. 16(6-7): p. 317-320.
5. Kalembe Małgorzata A. and M. Kapiszewska, *The influence of fruit, vegetable and folate intake on level of endogenous oxidative DNA damage in leukocytes of subjects with different polymorphism of COMT gene*, in XII International Conference on Polyphenols. 2004: Helsinki.
6. Kapiszewska, M., et al., *Uracil misincorporation into DNA of leukocytes of young women with positive folate balance depends on plasma vitamin B12 concentrations and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. A pilot study*. J Nutr Biochem, 2005. 16(8): p. 467-78.
7. Duthie, S.J., et al., *Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells*. Nutr Cancer, 2000. 37(2): p. 245-51.
8. Fenech, M., *Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer*. Drug Discov Today, 2002. 7(22): p. 1128-37.
9. Larsson, S.C., E. Giovannucci, and A. Wolk, *Vitamin B6 intake, alcohol consumption, and colorectal cancer: a longitudinal population-based cohort of women*. Gastroenterology, 2005. 128(7): p. 1830-7.
10. Otani, T., et al., *Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitamin B2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan*. Nutr Cancer, 2005. 53(1): p. 42-50.
11. Wei, E.K., et al., *Plasma vitamin B6 and the risk of colorectal cancer and adenoma in women*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(9): p. 684-92.
12. Wierzbicki, A.S., *Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence*. Diab Vasc Dis Res, 2007. 4(2): p. 143-150.

13. Duthie, S.J., *Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability*. Br Med Bull, 1999. 55(3): p. 578-92.
14. Habib, E.E., M. Aziz, and M. Kotb, *Genetic polymorphism of folate and methionine metabolizing enzymes and their susceptibility to malignant lymphoma*. J Egypt Natl Canc Inst, 2005. 17(3): p. 184-92.
15. Wang, X., et al., *Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21*. Mutat Res, 2004. 551(1-2): p. 167-80.
16. Molloy, A.M., *Folate and homocysteine interrelationships including genetics of the relevant enzymes*. Curr Opin Lipidol, 2004. 15(1): p. 49-57.
17. Molloy, A.M., *Folate bioavailability and health*. Int J Vitam Nutr Res, 2002. 72(1): p. 46-52.
18. Fenech, M. and L.R. Ferguson, *Vitamins/minerals and genomic stability in humans*. Mutat Res, 2001. 475(1-2): p. 1-6.
19. Hart, D.J., et al., *Determination of 5-methyltetrahydrofolate (13C-labeled and unlabeled) in human plasma and urine by combined liquid chromatography mass spectrometry*. Anal Biochem, 2002. 305(2): p. 206-13.
20. Fenech, M., *Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability*. Mutat Res, 2001. 480-481: p. 51-4.
21. Bruinse, H.W. and H. van den Berg, *Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1995. 61(1): p. 31-7.
22. Walsh, T., et al., *Maternal folate status and neural tube defects in Ireland: the need for a national food fortification program*. Ir Med J, 2007. 100(5): p. 469-72.
23. Ueland, P.M. and R. Clarke, *Homocysteine and cardiovascular risk: considering the evidence in the context of study design, folate fortification, and statistical power*. Clin Chem, 2007. 53(5): p. 807-9.
24. Morris, M.S., et al., *Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification*. Am J Clin Nutr, 2007. 85(1): p. 193-200.
25. Martinez, M.E., et al., *Folate fortification, plasma folate, homocysteine and colorectal adenoma recurrence*. Int J Cancer, 2006. 119(6): p. 1440-6.
26. Bower, C., et al., *Plenty of evidence on mandatory folate fortification*. Aust N Z J Public Health, 2006. 30(1): p. 81-2; author reply 82-3.
27. Lawrence, J.M., et al., *Trends in serum folate after food fortification*. Lancet, 1999. 354(9182): p. 915-6.

28. Ames, B.N., *DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer*. Mutat Res, 2001. 475(1-2): p. 7-20.
29. Duthie, S.J. and A. Hawdon, *DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro*. FASEB J, 1998. 12(14): p. 1491-7.
30. Fenech, M., *Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology*. Toxicology, 2002. 181-182: p. 411-6.
31. Finglas, P.M., et al., *Is there more to folates than neural-tube defects?* Proc Nutr Soc, 2003. 62(3): p. 591-8.
32. Abu-Amero, K.K., C.A. Wyngaard, and N. Dzimiri, *Prevalence and role of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T and 1298 A-->C polymorphisms in coronary artery disease in Arabs*. Arch Pathol Lab Med, 2003. 127(10): p. 1349-52.
33. Parle-McDermott, A., et al., *The MTHFR 1298CC and 677TT genotypes have opposite associations with red cell folate levels*. Mol Genet Metab, 2006. 88(3): p. 290-4.
34. Antonina Ostrowska. „KOBIEITY I MĘŻCZYŹNI. JAK STYL I WARUNKI ŻYCIA RÓŻNICUJĄ ZDROWIE”. ROCZNIK LUBUSKI Tom 32, cz. 2, 2006

ZAŁĄCZNIK 5D.

POLIMORFIZM GENÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA METABOLIZM ESTRADIOLU A RYZYKO NOWOTWORÓW HORMONUZALEŻNYCH¹

Małgorzata Kalembe-Drożdż, Maria Kapiszewska

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych

STRESZCZENIE:

Stężenie steroidowych hormonów płciowych w organizmie zależy od czynników fizjologicznych, środowiskowych i genetycznych. Poziom estrogenów oraz ich dostępność w organizmie zależy w dużej mierze od aktywności enzymów biorących udział w ich syntezie i katabolizmie oraz siły wiązania estrogenów przez specyficzne białka transportowe i receptory estrogenowe. Wszystkie te białka kodowane są przez polimorficzne geny, co sprawia, że każda osoba charakteryzuje się odmiennymi zdolnościami metabolizowania estrogenów. Natomiast metabolizm estrogenów jest czynnikiem modyfikującym ryzyko zachorowania na nowotwory hormono-zależne.

ABSTRACT:

The sex steroid hormones levels depend on the physiological, environmental and genetic factors. The concentration of estrogens and their bioavailability is determined by the activity of enzymes involved in estrogens synthesis, catabolism and the strength of estrogens interaction with specified binding proteins and receptors. All the above proteins are coded by polymorphic genes, which lead to high inter-individual differences in estrogens metabolizing abilities. Moreover the estrogens metabolism is the factor which modulates the risk of hormone-dependent cancers.

Słowa kluczowe: estradiol, polimorfizm genetyczny, kancerogeneza, CYP, COMT

Key words: estradiol, genetic polymorphism, cancerogenesis, CYP, COMT

¹ Niniejszy maszynopis został opublikowany jako: M. Kalembe-Drożdż, M. Kapiszewska, *Polimorfizm genów odpowiedzialnych za metabolizm estradiolu a ryzyko nowotworów*, [w:] *Środowisko i gospodarka hormonalna u kobiet*, t. II: *Zaburzenia w metabolizmie estrogenów i ich konsekwencje*, red. nauk. M. Kapiszewska, Kraków 2011, s. 163–179.

WPROWADZENIE

Estrogeny są uważane za czynnik kancerogeny, ale wykazano także, że w pewnych warunkach mogą wykazywać działanie przeciwutleniające. Natomiast ryzyko nowotworów hormono-zależnych wzrasta proporcjonalnie do czasu całkowitej kumulatywnej ekspozycji na estrogeny w ciągu życia kobiety (Mitrinen 2003, Hiraku 2001). Stężenie steroidowych hormonów płciowych w organizmie zależy od czynników fizjologicznych, środowiskowych i genetycznych. Poziom estrogenów w organizmie zależy w dużej mierze od aktywności enzymów biorących udział w ich syntezie i katabolizmie, kodowanych m.in. przez polimorficzne geny. Polimorfizm genetyczny to występowanie alternatywnych sekwencji DNA u części populacji (częściej niż u 1%). Mogą powodować zmianę: aminokwasu w kodowanym białku, poziomu ekspresji genu lub stabilności transkryptu. Polimorfizm często dotyczy tylko jednego nukleotydu (*SNP – single nucleotide polymorphism*). Polimorfizmy omawianych genów mogą być skorelowane ze odmienną podatnością na nowotwory piersi, szyjki macicy oraz mogą być wskaźnikiem wczesnego dojrzewania płciowego, jak pokazały wyniki wielu badań epidemiologicznych (Griffits 2002, Lai 2001).

BIAŁKA WIĄŻĄCE ESTROGENY

W 98% estrogeny w krążeniu występują w postaci związanej z białkami osocza: albuminą oraz globuliną wiążącą sterydy płciowe (SHBG – Sex Hormon Binding Globulin). Niezwiązane z białkami hormony sterydowe mają zdolność przenikania przez błonę komórkową i wiązania się z receptorem cytoplazmatycznym. W obrębie genu kodującego SHBG, zlokalizowanego na 17 chromosomie, zidentyfikowano ponad 10 miejsc polimorficznych (Thompson 2008). Obecność zmutowanych alleli SHBG oraz zmienność ekspresji genu pod wpływem np.: estrogenów, modyfikuje poziom tej globuliny. Stwierdzono, iż wysokie stężenie SHBG we krwi jest skorelowane z mniejszym ryzykiem raka piersi, macicy, prawdopodobnie wskutek zmniejszonego stężenia wolnych hormonów w osoczu (Nagel 2004, Dunning 2004).

Oddziaływanie hormonów steroidowych odbywa się poprzez receptory steroidowe obecne w cytoplazmie i jądrze docelowych komórek. Kompleks dimerycznego receptora estrogenowego (ER) związanego z estrogenem pełni rolę jądrowego czynnika transkrypcyjnego w kompleksie polimerazy RNA II zależnej od DNA, który wiąże się do regulatorowych sekwencji EREs (Estrogen Response Elements) w rejonie promotorowym docelowych genów oraz do aktywacji acetylotransferazy histonów uruchamiając ekspresję genów i np.: stymulując komórkę do podziału.

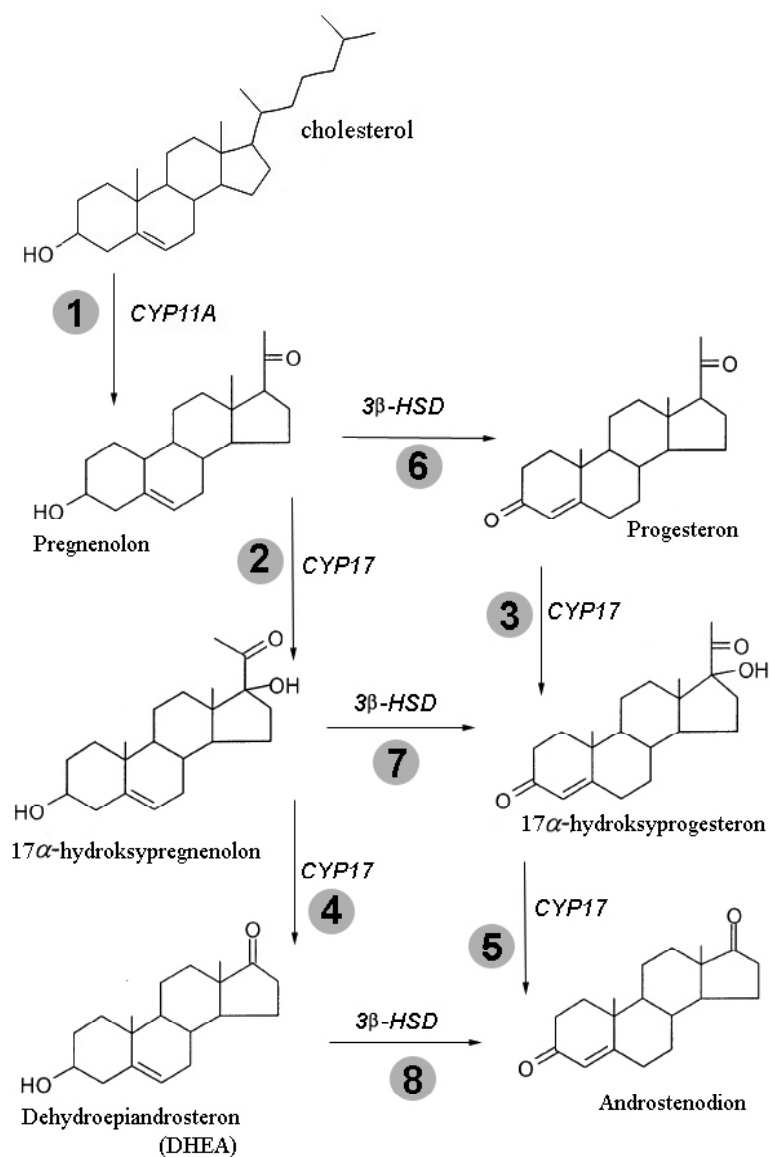
Zarówno ER- α jak i ER- β występują w licznych formach polimorficznych. W genie kodującym receptor estrogenowy typu *alfa* występują dwa pojedynczonukleotydowe polimorfizmy w obrębie intronu 1 oraz dwunkleotydowe powtórzenia (GT) powyżej eksonu 1D, które są związane z modyfikacją ryzyka nowotworów piersi (Boyapati 2005) prawdopodobnie poprzez zmianę ilości dostępnych receptorów ER- α . W genie kodującym receptor estrogenowy typu beta występują polimorfizmy w obrębie eksonów 5 i 7 (Aschim 2005), które nie zmieniając sensu informacji genetycznej, mogą istotnie wpływać na stabilność genetyczną komórek poprzez modyfikację siły wiązania estrogenów lub ich oddziaływania z DNA.

BIOSYNTENZA ESTRADIOLU

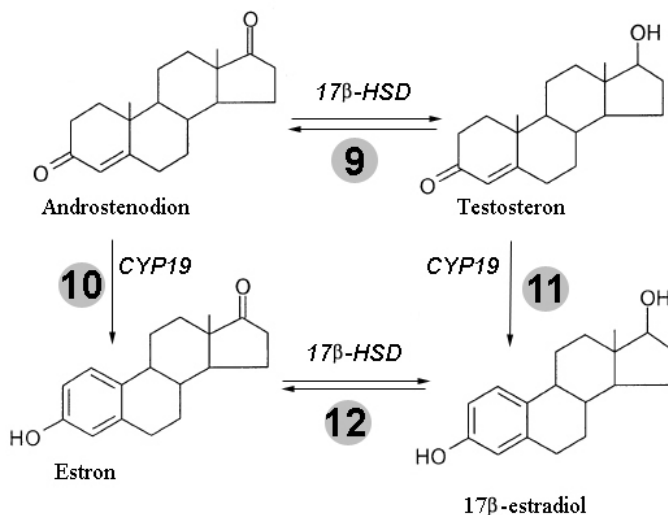
Steroidowe hormony płciowe powstają z cholesterolu przy udziale hydroksylaz systemu cytochromu P450, NADPH i tlenu cząsteczkowego. Enzymami odpowiedzialnymi za proces biosyntezy estrogenów są: desmolaza cholesterolowa (CYP11A1), 17 α -hydroksylaza (CYP17), aromataza (CYP19) oraz dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa (17 β -HSD).

Pierwszy etap biosyntezy estrogenów u kobiet w wieku reprodukcyjnym przebiega w komórkach otoczki wewnętrznej jajników. W tym etapie z cholesterolu powstaje testosteron i androstenodion (Ryc. 1). Dalsze reakcje tego szlaku odbywają się w komórkach ziarnistych (Ryc. 2). Estrogeny są także syntetyzowane przez podskórne komórki tłuszczowe i komórki nabłonkowe sutka, zaś w czasie ciąży produkowane są przez łożysko.

Pierwszym enzymem szlaku biosyntezy hormonów sterydowych jest desmolaza cholesterolowa, czyli cytochrom P450 α 11A (CYP11A1) (EC 1.14.15.6). Katalizuje ona reakcję przekształcenia cholesterolu w pregnenolon poprzez odszczepienie łańcucha bocznego (reakcja 1). Gen CYP11A1 jest zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu piętnastego (15q24). W rejonie niekodującym 5' genu CYP występuje polimorfizm mikrosatelitarny polegający na występowaniu powtórzeń pentanukleotydowych [TTTTA]_n. Sugeruje się, iż polimorfizm ten podnosi ryzyko wystąpienia zespołu policystycznych jajników (Modugno 2004).



Ryc. 1. Synteza 17 β -estradiolu. Etapy od cholesterolu do androstenediolu.



Ryc. 2. Synteza 17β-estradiolu. Etapy od androstenodiolu do 17β-estradiolu. Opis kolejnych reakcji w tekście.

Kolejne etapy syntezy hormonów sterydowych katalizuje enzym CYP17 (cytochrom P450c17) (EC 1.14.99.9), posiadający aktywność 17α-hydroksylazy i 17,20-liazy. Jedno z centrów aktywnych enzymu odpowiada za 17α-hydroksylację pregnenolonu (reakcja 2) i progesteronu (reakcja 3) do ich 17α-hydroksylovych pochodnych. Drugie centrum aktywne katalizuje reakcję przekształcenia 17α-hydroksypregnenolonu w dehydroepiandrosteron (DHEA) (reakcja 4) oraz 17α-hydroksyprogesteronu w androstenedion (reakcja 5). Centra aktywne CYP17 odpowiedzialne za hydroksylację i hydrolizę podlegają niezależnej regulacji. Aktywność 17,20-liazowa cytochromu CYP17 decyduje o wielkości frakcji pregnenolonu i progesteronu, jaka posłuży do syntezy hormonów płciowych, a jaka do syntezy hormonów kory nadnerczy: kortyzolu (w warstwie pasmowatej) i aldosteronu (w warstwie kłębkowatej) (Kristensen 2005). Gen CYP17 zawiera 8 eksonów i jest położony na dłuższym ramieniu 10 chromosomu (10q24.3). Polimorfizm genu CYP17 występujący w rejonie 5' genu nie objętym transkrypcją, wynikający z transycji tyminy na cytozynę w pozycji -27 nazwano polimorfizmem A2. Tworzy on kasetę CCACC powyżej promotora genu, sekwencję rozpoznawaną przez czynnik transkrypcyjny SP1, co hipotetycznie może zwiększać częstość inicjacji transkrypcji genu. Pokazano, że kobiety w wieku rozrodczym posiadające ten zmutowany allel CYP17

mają wyższe stężenie estrogenów we krwi w porównaniu do kobiet posiadających allel dziki (A1) (Miyoshi 2003, Jasieńska 2006). Nie udało się jednak w badaniach *in vitro* wykazać zwiększenia częstości inicjacji transkrypcji genu z tą polimorficzną zmianą. Także ten polimorficzny allel skorelowany jest ze wzrostem ryzyka wystąpienia nowotworów piersi (Mitrunen 2003, Ahsan 2005).

Dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa (3 β -HSD, Δ 5,4-izomeraza), EC 1.1.1.145, to enzym odpowiadający za izomeryzację pregnenolonu do progesteronu (reakcja 6), 17 α -hydroksypregnenolonu do 17 α -progesteronu (reakcja 7) i DHEA do androsteonodionu (reakcja 8) oraz 16 β -hydroksydehydroepiandrosteronu do 16 β -hydroksyandrostenedionu. W genie 3 β -HSD występują przynajmniej 4 polimorfizmy, które modyfikują sekwencję aminokwasów białka i 7 innych, które być może wpływają na poziom ekspresji białka (Wang 2007).

Następnie androstenedion jest przekształcany w testosteron przez dehydrogenazę 17 β -hydroksysteroidową (17 β -HSD) (EC 1.1.1.51) [116] (reakcja 9). Gen zlokalizowany na 10 chromosomie (10p14,15) i występuje w nim m.in. polimorfizm Ser312Gly (A/G), który jest wiązany z modyfikacją ryzyka raka endometrium (Dumas 2010).

Aromataza (EC 1.14.14.1), czyli enzym kodowany przez gen CYP19, katalizuje końcowy etap trzystopniowego utlenienia w reakcji konwersji androstenedionu w estron (reakcja 10) oraz testosteronu w 17 β -estradiol (reakcja 11). Aktywność aromatazy decyduje o ostatecznym stężeniu 17 β -estradiolu (Milczarek 2005).

Gen CYP19 leży na dłuższym ramieniu chromosomu 15 (15q21.2) i zawiera dziesięć eksonów. Ekson 1 występuje w kilku kopiach, zaopatrzonych we własne rejony promotorowe. Ekspresja genu aromatazy jest tkankowo-specyficzna a regulacja odbywa się przez wykorzystanie alternatywnych promotorów. W genie CYP19 występuje polimorfizm polegający na występowaniu 7 do 12-krotnych tetranukleotydowych powtórzeń o sekwencji TTTA w obrębie intronu 4, z dodatkowym jeszcze najkrótszym allelem z 7 powtórzeniami sekwencji w połączeniu z delecją trzech nukleotydów TCT powyżej regionu mikrosatelitarnego (Ahsan 2005, Berstein 2004). Badania prowadzone na różnych populacjach wykazują odmienną podatność na nowotwory hormono-zależne u kobiet posiadających różne allele CYP19. Zwiększenie ryzyka raka endometrium (szczególnie allel z 10-krotnym powtórzeniem) i piersi (allel [TTTA]₁₂) jest związane z najdłuższymi sekwencjami. Pociąga to za sobą większą ekspresję genu i co za tym idzie wyższą syntezę 17 β -estradiolu. Natomiast allel najkrótszy (7-krotne powtórzenie tetranukleotydowe z delecją 3 par zasad [TTTA]₇-3) jest wiązany z podniesieniem ryzyka zachorowalności na nowotwory piersi ER-pozytywne.

W genie kodującym aromatazę, oprócz polimorfizmu mikrosatelitarnego, występuje pojedynczonukleotydowy polimorfizm w niekodującym rejonie 3'. Tranzycja tyminy na cytozynę powoduje spadek stabilności transkryptu.

17 β -estradiol może być odwracalnie utleniany do estronu przez dehydrogenazę 17 β -hydroksysteroidową (17 β -HSD) (reakcja 12) i/lub do estriolu pod wpływem aromatazy z 16-hydroksyandrostendionu.

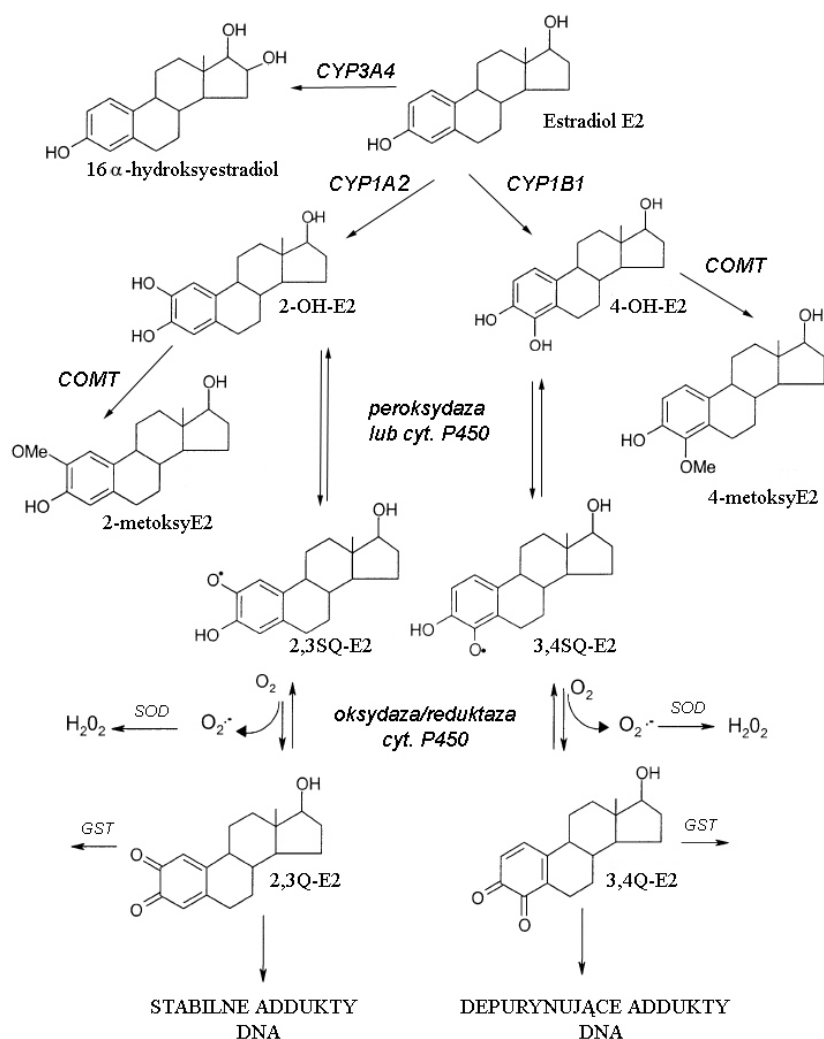
I FAZA KATABOLIZMU ESTRADIOLU

17 β -estradiol usuwany jest z organizmu w procesach detoksyfikacyjnych fazy I i II (Ryc. 3).

W przypadku, gdy utlenione metabolity estradiolu nie zostaną inaktywowane przez enzymy II fazy detoksyfikacji, mogą oddziaływać z materiałem genetycznym tworząc addukty do zasad azotowych DNA.

Produktami katabolizmu w obrębie pierścienia A są estrogeny katecholowe 2- i 4-hydroksyestradiol oraz 2- i 4-hydroksyestron, natomiast w wyniku katabolizmu estrogenów w obrębie pierścienia D powstają 16 α -hydroksyestron i estriol.

CYP1B1 jest głównym enzymem odpowiedzialnym za hydroksylację 17 β -estradiolu przy węglu w pozycji 4. Cytochrom P4501B1 ulega ekspresji w tkankach takich jak serce, mózg, płuca, łożysko, nerki, macica, jajniki, piersi (Lai 2001). Oprócz estrogenów, enzym ten katabolizuje liczne związki heterocykliczne jak np.: PAH, aminy aryłowe, TCDD (tetrachlorodibenzenodioksyny). CYP1B1 ulega konstytutywnej ekspresji, przy czym może ona być dodatkowo indukowana przez wspomniane heterocykliczne substraty za pomocą receptora aryłowęglowodorowego AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor). CYP1B1 jest genem polimorficznym składającym się z 3 eksonów, leżącym na 2 chromosomie (2p21-p22). Występuje w nim 6 pojedynczonukleotydowych polimorfizmów (SNP) (Mitru-nen 2003). Należą do nich: tranzycja cytozyny na tyminę w intronie 1; transwersja cytozyny na guaninę w obrębie eksonu 2 (kodon 48) powodująca zmianę argininy na glicynę; transwersja G na T w eksonie 2 zmieniająca sens kodonu 119 (alanina na serynę); zamiana G na C w eksonie 3 powodująca, że zamiast waliny wbudowywana jest leucyna w kodonie 432; tranzycja cytozyny na tyminę w kodonie 449 (bez zmiany sensu); oraz tranzycja adeniny na guaninę w kodonie 453 (asparagina na serynę). Polimorficzne zmiany w sekwencji 2 i 3 eksonu mają wpływ na zmianę własności katalitycznych białka. Mutacja w kodonie 432 w obrębie eksonu 3, który koduje domenę wiążącą hem, powoduje, iż taki enzym wykazuje 2-4-krotnie wyższą aktywność katalityczną w porównaniu do białka dzikiego typu (Lai 2001, Sasaki 2004). Wysoka aktywność CYP1B1 może prowadzić do wzrostu stężenia 4-hydroksyestradiolu w surowicy oraz do zmiany stosunku pomiędzy 4- i 2-hydroksylowymi pochodnymi.



Ryc. 3. Podstawowe szlaki katabolizmu 17β-estradiolu (E2). Enzymy I fazy detoksyfikacji: CYP1A2, CYP1B1. Enzymy II fazy detoksyfikacji: COMT (0-metyltransferaza katecholowa) i GST (transferaza glutationowa).

Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, iż polimorfizmy w kodonach 119 oraz 432 są związane ze wzrostem ryzyka zachorowania na raka endometrium oraz piersi (Mitrinen 2003, Galicchio 2006, Miyoshi 2003).

Jednym z enzymów hydroksylujących 17β -estradiol i 17β -estron przy węglu w pozycji 2 pierścienia A jest cytochrom P4501A1. Gen ten ulega ekspresji w tkankach niewątrobowych takich jak: płuca, piersi, limfocyty, łożysko, jednak nie konstytutywnie i bez indukcji trudno jest zaobserwować obecność mRNA cytochromu 1A1. Podobnie jak CYP1B1, CYP1A1 odpowiada za aktywację związków policyklicznych w I fazie detoksyfikacji. Opisano siedem polimorfizmów występujących w obrębie sekwencji genu CYP1A1 leżącego na dłuższym ramieniu chromosomu 15 (15q23) (Lai 2001). Dwa z nich, oznaczane jako polimorfizmy m1 oraz m2, są fenotypowo związane ze wzrostem aktywności enzymu (Berstein 2004). Polimorfizm m1 to tranzycja tyminy na cytozynę w 3' niekodującym odcinku genu w pozycji oddalonej o 250 par zasad od miejsca poliadenylacji, która powoduje zmianę w regulacji ekspresji genu i wydłużenie czasu pół-trwania transkryptu w cytoplazmie. Natomiast polimorfizm m2 to tranzycja adeniny na guaninę w eksonie 7, kodującym domenę wiążącą hem, która prowadzi do wbudowywania izoleucyny zamiast waliny w kodonie 462. Sugerowany jest związek polimorficznych form CYP1A1, kodujących enzym o wyższej aktywności ze wzrostem ryzyka zapadnięcia na nowotwory piersi (Miyoshi 2003). CYP1A1 ze względu na niską specyficzność, katalizuje również reakcję hydroksylacji pierścienia A w pozycji 4. Proporcja pomiędzy produktami 4-hydroksylacji i 2-hydroksylacji wynosi dla CYP1A1 1:4.

CYP1A2 jest najbardziej aktywnym enzymem odpowiedzialnym za 2-hydroksylację 17β -estradiolu i estronu (EC 1.14.14.1.) Stwierdzono, iż jego gen zlokalizowany na 15 chromosomie, ulega ekspresji wyłącznie w wątrobie osób dorosłych. Wystąpienie transwersji A do C w introonie 1 (pozycja 734) powoduje wzmożenie indukcji ekspresji tego genu. U osób będących nosicielami tego polimorfizmu stwierdzono przewagę 2-hydroksylacji nad 4-hydroksylacją prowadząc do obniżenia negatywnego wpływu estrogenów na tkanki (Lai 2001). CYP1A2 w retikulum endoplazmatycznym może katalizować również hydroksylację estrogenów w pozycji 4, jednak te reakcje przebiegają zdecydowanie w mniejszym stopniu niż hydroksylacja w pozycji 2. 2-hydroksypochodne 17β -estradiolu uważane są za czynnik antyproliferacyjny (Mitrinen 2003).

Inną drogą metabolizmu 17β -estradiolu i estronu u kobiet jest ich 16α -hydroksylacja katalizowana przez cytochrom CYP3A4. Jest to również główny enzym odpowiedzialny za katabolizm testosteronu przez 6β - 2β - i 15β -hydroksylację. Zwiększona hydroksylacja w pozycji węgla 16 wydaje się być skorelowana z podniesionym ryzykiem zachorowania na nowotwory piersi (Lai 2001). Cytochromy P4503A, ze względu na dość niską specyficzność katalizy, odpowiadają również za 2-hydroksylację estrogenów (około 1/3 puli 2-hydroksyestradiolu jest produktem re-

akcji katalizowanej przez CYP3A4). Wystąpienie tranzykcji adeniny na guaninę w 5' regionie regulatorowym genu CYP3A4 (polimorfizm 1B) powoduje zmianę aktywności enzymu. Stwierdzono, iż ta mutacja wiąże się ze spadkiem aktywności hydroksylacji w pozycji 6 oraz wzrostem aktywności 16 α -hydroksylacji polimorficznego enzymu w stosunku do białka dzikiego (Murayama 2007). CYP3A4 ulega inhibicji w obecności α -tokoferolu i luteiny oraz ketokonazolu i progesteronu, natomiast jego aktywność rośnie pod wpływem kwercetyny, brokułów i substancji z dymu tytoniowego oraz glukokortykoidów. Sugerowane jest występowanie wyższego poziomu testosteronu u kobiet będących homozygotami zmutowanego allelu. Polimorfizm 1B genu CYP3A4 jest skorelowany z występowaniem wczesnego miesiączkowania u dziewcząt oraz podniesieniem ryzyka zachorowania na raka piersi. Potwierdza to wysoki poziom 16-hydroksyestronu występujący m.in. w nowotworach piersi, endometrium i szyjki macicy. 16 α -hydroksyestron ma wyższe powinowactwo do ER niż 17 β -estradiol [10]. Sugeruje się również, że 16 α -hydroksyestron stymuluje produkcję prostacyklin przez komórki nabłonkowe naczyń krwionośnych (Mueck 2002). Ponadto stwierdzono, iż 16 α -hydroksyestron wpływa na obniżenie ekspresji receptorów estrogenowych.

II FAZA DETOKSYFIKACJI

Katecholowe estrogeny są inaktywowane na drodze *O*-metylacji, glukuronizacji, sulfatacji lub skoniugowania z glutationem. Koniugacja katecholowych estrogenów z którąś z powyższych grup blokuje ich potencjał hormonalny oraz uniemożliwia dalsze utlenianie do reaktywnych wolnorodnikowych związków w cyklu semi-chinonowym. Reakcje II fazy detoksyfikacji są istotne, ponieważ jeśli do nich nie dojdzie, w trakcie cyklicznych reakcji utleniania i redukcji katecholowych pochodnych estrogenów i przechodzenia pomiędzy formami chinon – hydrochinon z udziałem tlenu cząsteczkowego generowane są duże ilości anionorodnika nadadtlenkowego. Anionorodnik nadadtlenkowy może być redukowany enzymatycznie lub nieenzymatycznie do nadttlenku wodoru i dalej do innych RFT. Generowanie RFT prowadzi do nasilenia się stanu stresu oksydacyjnego w komórce.

RFT powstają również w wyniku alternatywnych reakcji nieenzymatycznych estrogenów katecholowych z jonami metali. Produkty pośrednie tych przemian mogą modyfikować zasady azotowe, wprowadzać pojedyncze pęknięcia do nici i oksydacyjne uszkodzenia DNA.

Główną drogą inaktywacji 2- i 4- katecholowych estrogenów w organizmie jest *O*-metylacja przez *O*-metyltransferazę katecholową (COMT, EC 2.1.1.6.). Metylacja uniemożliwia dalsze przemiany katecholi do chi-

nonów i semichinonów zmniejszając tym samym powstawanie form rodnikowych. COMT katalizuje przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylu-L-metioniny (SAM) na jedną z grup hydroksylowych w ugrupowaniu katecholowym (preferencyjnie przy węglu 3) (Zhu 2002).

Dwie formy (rozpuszczalna i błonowa) są kodowane przez gen zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 22. W genie COMT występuje polimorfizm w obrębie 3 eksonu. W formie cytoplazmatycznej zmiana ulega adenina na guaninę w kodonie 108, a w formie zasocjowanej z błoną w kodonie 158, co powoduje zastąpienie waliny metioniną, co z kolei skutkuje 3- do 4-krotne zmniejszenie aktywności enzymatycznej białka kodowanego przez allel zmutowany.

Czynnikiem wpływającym na tempo metylacji katalizowanej przez COMT jest również dostępność grup metylowych dostarczanych z SAM podczas metabolizmu folianów. Ich stężenie także zależne jest od aktywności jednego z głównych enzymów szlaku metylacyjnego, reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) (EC 1.5.1.20), która jest enzymem limitującym cykl aktywnego metylu, kodowanym przez polimorficzny gen MTHFR znajdujący się na chromosomie 1p36.3. W obrębie eksonu 4 kodującego domenę katalityczną MTHFR występuje tranzycja cytozyny na tyminę w pozycji 677 w 222 kodonie powodując zastąpienie alaniny waliną w białku. Zmiana ta skutkuje powstaniem enzymu o niższej aktywności katalitycznej oraz o niższej stabilności cieplnej w warunkach *in vitro* (Abu-Amero 2003). Drugi polimorfizm to transwersja adeniny na cytozynę w pozycji 1298 w obrębie eksonu 7. Powoduje to zamianę w kodonie 429 z glutaminianu na alaninę w obrębie domeny regulatorowej enzymu, co zmniejsza powinowactwo MTHFR do jego inhibitora S-adenozylometioniny (SAM).

Badania nad wpływem COMT na rozwój nowotworu piersi pokazały, że homozygoty LL są bardziej podatne na zachorowanie w okresie przedmenopauzalnym natomiast ryzyko wystąpienia nowotworu piersi w okresie pomenopauzalnym jest niższe niż u kobiet posiadających allel H (Mitrinen 2003). Może to wynikać z faktu, że kobiety posiadające dwa zmutowane allele są słabiej chronione przed działaniem katecholowych estrogenów. Stwierdzono, że 2-hydroksyestron i 2-hydroksyestradiol są dużo szybciej metabolizowane przez COMT niż 4-hydroksy-pochodne estrogenów. Ponadto 2-metoksyestradiol wykazuje, oprócz hamowania wzrostu komórek nabłonka, fibroblastów mięśnia sercowego, adipocytów, komórek gruczołowych jajnika, jak również właściwości antyangiogenne. Ma niskie powinowactwo do ER i nie wykazuje efektu estrogenowego. Efekt antyproliferacyjny 2-metoksyestradiolu jest wywierany poprzez aktywację ekspresji białek p53 i p34 oraz modulację polimeryzacji mikrotubul (Mueck 2002).

Inną drogą katabolizmu jest jego koniugacja z glutationem lub grupą sulfonową (Mitrunen 2001). Transferazy glutationowe (GST) EC 2.5.1.18, to bardzo liczna grupa cytoplazmatycznych enzymów katalizujących koniugację zredukowanego glutationu (GSH) do szeregu związków elektrofilowych, zwiększając tym samym ich rozpuszczalność w wodzie i ułatwiając wydalenie z organizmu. Transferazy glutationowe odpowiadają za inaktywację form chinonowych katecholowych estrogenów. Wszystkie geny z rodziny transferaz glutationowych typu: GSTM, GSTP, GSTT, GSTA i GSTZ występują w formach polimorficznych, co powoduje ogromne międzyosobnicze zróżnicowanie zdolności metabolizowania związków potencjalnie kancerogennych, przy czym np.: połowa populacji kaukaskiej w ogóle nie posiada genu kodującego GSTM1 i/lub genu GSTT1.

Sulfotransferaza steroidowa EC 2.8.2.1 odpowiada za przeniesienie reszty siarkowej na 17β -estradiol, estron, DHEA i cholesterol. Siarczan estronu jest nieaktywny biologicznie a jego poziom we krwi przekracza 5–10-krotnie stężenie nieskoniugowanych estrogenów takich jak estron, 17β -estradiol i estriol u kobiet w wieku rozrodczym, jak i menopauzalnym. Polimorfizm sulfotransferazy powoduje zamianę argininy na histydynę w pozycji 213. Sulfataza steroidowa katalizuje proces desulfatacji hormonów sterydowych, w której genie zidentyfikowano ponad 10 miejsc polimorficznych (Goodsell 2006). Ponieważ siarkowe pochodne estrogenów mają dość długi czas życia mogą stanowić pulę potencjalnie dostępnych hormonów, których stężenie zależy od równowagi między działaniem tych dwóch enzymów, których działanie jest modyfikowane przez posiadane polimorfizmy.

Kolejną drogą usuwania estrogenów z organizmu jest ich koniugacja z kwasem glukuronowym przez UDP-glukuroniltransferazę, w której genie występuje polimorfizm insercji (TA)_n w obrębie promotora, powodujący obniżenie ekspresji (Lord 2006).

PODSUMOWANIE

Każdą osobę charakteryzuje unikalna kombinacja genów polimorficznych kodujących enzymy i białka odpowiedzialne za syntezę estradiolu, jego transport, oddziaływanie i katabolizm. Wynikiem tego jest zdywersyfikowane stężenie estrogenów oraz niezmiennie zróżnicowana osobnicza podatność na kancerogenne działanie pochodnych estradiolu.

LITERATURA:

- Abu-Amero, K.K., Wyngaard C.A., Dzimir N., *Prevalence and role of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T and 1298 A-->C polymorphisms in coronary artery disease in Arabs*. Arch Pathol Lab Med, 2003. 127(10): p. 1349-52.
- Ahsan, H., i wsp., *Variants in estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 and breast cancer risk: a family-based genetic association study*. Breast Cancer Res, 2005. 7(1): p. R71-81.
- Berstein, L.M. i wsp., *CYP17 and CYP19 genetic polymorphisms in endometrial cancer: association with intratumoral aromatase activity*. Cancer Letters, 2004. 207: p. 191-196.
- Boyapati S.M. i wsp. Polymorphisms in ER- α Gene Interact with Estrogen Receptor Status in Breast Cancer Survival. Clin Cancer Res 2005;11:1093-1098
- Dumas I, Diorio C. Polymorphisms in genes involved in the estrogen pathway and mammographic density. BMC Cancer. 2010 Nov 22;10:636.
- Dunning, A.M., i wsp., *Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women*. J Natl Cancer Inst, 2004. 96(12): p. 936-45.
- Aschim E.L., i wsp. Polymorphism in the Estrogen Receptor- β Gene Is Associated with Male Infertility J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005
- Gallicchio, L., i wsp., *Polymorphisms in estrogen-metabolizing and estrogen receptor genes and the risk of developing breast cancer among a cohort of women with benign breast disease*. BMC Cancer, 2006. 6: p. 173.
- Goodsell, D.S., *The molecular perspective: estrogen sulfotransferase*. Oncologist, 2006. 11(4): p. 418-9.
- Griffiths, H.R., i wsp., *Biomarkers*. Mol Aspects Med, 2002. 23(1-3): p. 101-208
- Hiraku, Y., i wsp., *Catechol estrogens induce oxidative DNA damage and estradiol enhances cell proliferation*. Int J Cancer, 2001. 92(3): p. 333-7.
- Jasienska G., i wsp., *CYP17 genotypes differ in salivary 17-beta estradiol levels: a study based on hormonal profiles from entire menstrual cycles*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. 15(11): p. 2131-5.
- Kristensen V.N., i wsp., *Gene expression profiling of breast cancer in relation to estrogen receptor status and estrogen-metabolizing enzymes: clinical implications*. Clin Cancer Res, 2005. 11(2 Pt 2): p. 878s-83s.
- Lai J., i wsp., *CYP gene polymorphisms and early menarche*. Mol Genet Metab, 2001. 74(4): p. 449-57.
- Lord S.J., i wsp., *Polymorphisms in genes involved in estrogen and progesterone metabolism and mammographic density changes in women*

- randomized to postmenopausal hormone therapy: results from a pilot study.* Breast Cancer Res, 2005. 7(3): p. R336-44.
- Milczarek R., Klimek A., [Aromatase--key enzyme of estrogen biosynthesis]. Postepy Biochem, 2005. 51(4): p. 430-9.
- Mitrunen K., Hirvonen A., *Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism.* Mutat Res, 2003. 544(1): p. 9-41.
- Mitrunen, K., i wsp., *Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. 10(3): p. 229-36.
- Miyoshi Y., Noguchi S., *Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women.* Biomed Pharmacother, 2003. 57(10): p. 471-81.
- Modugno F., *Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review.* Am J Epidemiol, 2004. 159(4): p. 319-35.
- Mueck A.O., Seeger H., Lippert T.H., *Estradiol metabolism and malignant disease.* Maturitas, 2002. 43(1): p. 1-10.
- Murayama, N., i wsp., *Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes.* Biochem Pharmacol, 2007. 73(12): p. 2020-6.
- Nagel Susan C. i wsp. *Endocrine control of sexual differentiation: effects of the maternal-fetal environment and endocrine disrupting chemicals.* Advances in Molecular and Cell Biology, 2004. 34: p. 15-37
- Sasaki M., i wsp., *Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer.* Clin Cancer Res, 2004. 10(6): p. 2015-9.
- Thompson D. i wsp. *Identification of common variants in the SHBG gene affecting sex hormone binding globulin levels and breast cancer risk in postmenopausal women.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 December ; 17(12): 3490-3498.
- Wang L. i wsp. *Human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: Gene sequence variation and functional genomics.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;107(1-2):88-99
- Zhu B.T., *Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis.* Curr Drug Metab, 2002. 3(3): p. 321-49.